

UNTERSUCHUNG
DER INSULINRESISTENZ
BEI HOLSTEIN-FRIESIAN-KÜHEN
MIT HILFE DER
GLUCOSE-CLAMP-TECHNIK

Wilhelm Thevis

*Diss
München
1984*



Aus dem Institut für
Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. H. Zucker

Angefertigt unter Leitung von
Prof. Dr. D. Giesecke

UNTERSUCHUNG DER INSULINRESISTENZ BEI HOLSTEIN-FRIESIAN-KÜHEN
MIT HILFE DER GLUCOSE-CLAMP-TECHNIK

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Wilhelm Thevis
aus
Oberndorf/N

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. D. Giesecke
Korreferent: Prof. Dr. Dr. F. Bakels

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

	SEITE
1. Einführung und Zusammenfassung	1
1.1. Das Schicksal des Menschen im Weltbild des Hellenismus	1
1.2. Der Hellenismus als Weltanschauung	2
1.3. Die Entwicklung des Hellenismus	3
1.4. Die Hellenismus als Weltanschauung	4
1.5. Die Hellenismus als Weltanschauung	5
1.6. Die Hellenismus als Weltanschauung	6
1.7. Die Hellenismus als Weltanschauung	7
1.8. Die Hellenismus als Weltanschauung	8
1.9. Die Hellenismus als Weltanschauung	9
1.10. Die Hellenismus als Weltanschauung	10
1.11. Die Hellenismus als Weltanschauung	11
1.12. Die Hellenismus als Weltanschauung	12
1.13. Die Hellenismus als Weltanschauung	13
1.14. Die Hellenismus als Weltanschauung	14
1.15. Die Hellenismus als Weltanschauung	15
1.16. Die Hellenismus als Weltanschauung	16
1.17. Die Hellenismus als Weltanschauung	17
1.18. Die Hellenismus als Weltanschauung	18
1.19. Die Hellenismus als Weltanschauung	19
1.20. Die Hellenismus als Weltanschauung	20
1.21. Die Hellenismus als Weltanschauung	21
1.22. Die Hellenismus als Weltanschauung	22
1.23. Die Hellenismus als Weltanschauung	23
1.24. Die Hellenismus als Weltanschauung	24
1.25. Die Hellenismus als Weltanschauung	25
1.26. Die Hellenismus als Weltanschauung	26
1.27. Die Hellenismus als Weltanschauung	27
1.28. Die Hellenismus als Weltanschauung	28
1.29. Die Hellenismus als Weltanschauung	29
1.30. Die Hellenismus als Weltanschauung	30
1.31. Die Hellenismus als Weltanschauung	31
1.32. Die Hellenismus als Weltanschauung	32
1.33. Die Hellenismus als Weltanschauung	33
1.34. Die Hellenismus als Weltanschauung	34
1.35. Die Hellenismus als Weltanschauung	35
1.36. Die Hellenismus als Weltanschauung	36
1.37. Die Hellenismus als Weltanschauung	37
1.38. Die Hellenismus als Weltanschauung	38
1.39. Die Hellenismus als Weltanschauung	39
1.40. Die Hellenismus als Weltanschauung	40
1.41. Die Hellenismus als Weltanschauung	41
1.42. Die Hellenismus als Weltanschauung	42
1.43. Die Hellenismus als Weltanschauung	43
1.44. Die Hellenismus als Weltanschauung	44
1.45. Die Hellenismus als Weltanschauung	45
1.46. Die Hellenismus als Weltanschauung	46
1.47. Die Hellenismus als Weltanschauung	47
1.48. Die Hellenismus als Weltanschauung	48
1.49. Die Hellenismus als Weltanschauung	49
1.50. Die Hellenismus als Weltanschauung	50
1.51. Die Hellenismus als Weltanschauung	51
1.52. Die Hellenismus als Weltanschauung	52
1.53. Die Hellenismus als Weltanschauung	53
1.54. Die Hellenismus als Weltanschauung	54
1.55. Die Hellenismus als Weltanschauung	55
1.56. Die Hellenismus als Weltanschauung	56
1.57. Die Hellenismus als Weltanschauung	57
1.58. Die Hellenismus als Weltanschauung	58
1.59. Die Hellenismus als Weltanschauung	59
1.60. Die Hellenismus als Weltanschauung	60
1.61. Die Hellenismus als Weltanschauung	61
1.62. Die Hellenismus als Weltanschauung	62
1.63. Die Hellenismus als Weltanschauung	63
1.64. Die Hellenismus als Weltanschauung	64
1.65. Die Hellenismus als Weltanschauung	65
1.66. Die Hellenismus als Weltanschauung	66
1.67. Die Hellenismus als Weltanschauung	67
1.68. Die Hellenismus als Weltanschauung	68
1.69. Die Hellenismus als Weltanschauung	69
1.70. Die Hellenismus als Weltanschauung	70
1.71. Die Hellenismus als Weltanschauung	71
1.72. Die Hellenismus als Weltanschauung	72
1.73. Die Hellenismus als Weltanschauung	73
1.74. Die Hellenismus als Weltanschauung	74
1.75. Die Hellenismus als Weltanschauung	75
1.76. Die Hellenismus als Weltanschauung	76
1.77. Die Hellenismus als Weltanschauung	77
1.78. Die Hellenismus als Weltanschauung	78
1.79. Die Hellenismus als Weltanschauung	79
1.80. Die Hellenismus als Weltanschauung	80
1.81. Die Hellenismus als Weltanschauung	81
1.82. Die Hellenismus als Weltanschauung	82
1.83. Die Hellenismus als Weltanschauung	83
1.84. Die Hellenismus als Weltanschauung	84
1.85. Die Hellenismus als Weltanschauung	85
1.86. Die Hellenismus als Weltanschauung	86
1.87. Die Hellenismus als Weltanschauung	87
1.88. Die Hellenismus als Weltanschauung	88
1.89. Die Hellenismus als Weltanschauung	89
1.90. Die Hellenismus als Weltanschauung	90
1.91. Die Hellenismus als Weltanschauung	91
1.92. Die Hellenismus als Weltanschauung	92
1.93. Die Hellenismus als Weltanschauung	93
1.94. Die Hellenismus als Weltanschauung	94
1.95. Die Hellenismus als Weltanschauung	95
1.96. Die Hellenismus als Weltanschauung	96
1.97. Die Hellenismus als Weltanschauung	97
1.98. Die Hellenismus als Weltanschauung	98
1.99. Die Hellenismus als Weltanschauung	99
1.100. Die Hellenismus als Weltanschauung	100

Die Arbeit wurde aus Mitteln der
H. WILHELM SCHAUMANN-STIFTUNG
unterstützt

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 Einleitung und Problemstellung	1
1.1 Zum Kohlenhydratstoffwechsel der Wiederkäuer und dessen Bedeutung für die Laktation	1
1.1.1 Der Plasma-Glucose-Spiegel beim Rind	4
1.1.2 Insulin und seine Bedeutung bei den Wiederkäuern	7
1.2 Bestimmung der Insulinresistenz	12
1.3 Problemstellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung	19
2.2 Versuchszeitplan	21
2.3 Glucose-Clamp-Test	21
2.4 Intravenöser Glucose-Toleranz-Test	26
2.5 Inulinraum	27
2.6 Probengewinnung	30
2.7 Analytische Methoden	30
2.7.1 Plasma-Glucose-Bestimmung	30
2.7.2 Plasma-Inulin-Bestimmung	31
2.7.3 Plasma-Insulin-Bestimmung	33
2.8 Statistische Methoden	36

	Seite
3 Ergebnisse	37
3.1 Basaler Plasma-Glucose-Spiegel	37
3.2 Basaler Plasma-Insulin-Spiegel	39
3.3 Glucose-Clamp-Test	40
3.3.1 Plateau-Werte für Glucose und Insulin	40
3.3.2 Metabolische Clearance-Rate von Insulin, Korrelationen beim Glucose-Clamp-Test	43
3.4 Intravenöser Glucose-Toleranz-Test	48
3.4.1 Insulinantwort auf den intravenösen Glucose-Toleranz-Test	51
3.5 Inulinraum	55
4 Diskussion	58
5 Zusammenfassung	68
5.1 Summary	70
6. Literaturverzeichnis	72

1. Einleitung und Problemstellung

1978 formulierte Trenkle in der Einleitung eines Artikels über Zusammenhänge zwischen Hormonen und Wiederkäuermetabolismus folgendes: "Größere Fortschritte, die die Effizienz der Tierproduktion steigern werden, erfordern ein verbessertes Wissen über die Faktoren, die den Metabolismus sowie die Verwertung der Futtermittel beeinflussen." Diesen Grundgedanken kann man aus vielen anderen wissenschaftlichen Arbeiten desselben Gebietes herauslesen (Hove, 1978, Giesecke und Stangassinger, 1982, Kronfeld et al., 1982).

1.1 Zum Kohlenhydratstoffwechsel der Wiederkäuer und dessen Bedeutung für die Laktation

Auch bei den Wiederkäuern, die einen wesentlich niedrigeren Plasma-Glucose-Spiegel als die Monogastrier aufweisen, nimmt der Kohlenhydratstoffwechsel eine zentrale Rolle des Intermediärmetabolismus ein (Bines und Hart, 1982).

Über die Bedeutung der Glucose und ihre Verwertbarkeit für die Milchkuh gibt folgendes Rechenbeispiel vielleicht am anschaulichsten Auskunft: Die für die Experimente der vorliegenden Arbeit bereitstehenden Kühe entstammen alle einer Milchviehherde, mit einer Durchschnittsjahresleistung von rund 7.000 kg Milch/Kuh. Der Laktosegehalt von Kuhmilch liegt mit nur geringen physiologischen Schwankungen bei 4,85 % (Mayer, 1978). Eine Kuh produziert so pro Jahr ca. 340 kg Milchzucker - mehr als die Hälfte ihres Eigengewichtes. Natürlich wird Glucose im Euter außer zur Laktoseproduktion auch zur Produktion von Glycerin und als Energiesubstrat zur Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH für die Lipogenese herangezogen (Baird, 1982). Bei Untersuchungen von Bickerstaffe et al. (1974) an zwei Holstein-Friesian-Kühen waren zwischen 50 und 73 g Glucose zur Erzeugung von einem Liter Milch notwendig. Im Gegensatz zu den Monogastricern, sowie den monogastrisch verdauenden jungen Wiederkäuern, kommt der enteralen Resorption von Glucose bei der Milchkuh nur eine geringe Bedeutung zu (Baird, 1982), obwohl die Fähigkeit dazu bis zu ca. 1 kg/Kuh und Tag durchaus gegeben ist, wie Studien an Kühen mit Labmagenfisteln zeigen (Frobish und Davis, 1977, Pehrson und Knutsson, 1980).

Der Grund hierfür liegt in der intraruminalen Vergärung der Nährsubstrate zu niederen Fettsäuren durch Mikroorganismen (Baird, 1982). Das Mengenverhältnis der hierbei entstehenden Fettsäuren ist abhängig vom Futter und von der Art der Mikroorganismen. Bei den energiereichen Kraftfuttermischungen, die zur Aufrechterhaltung hoher Milchleistungen bei Kühen nötig sind, ist dieses Mengenverhältnis zugunsten der Propionsäure gegenüber Essig- und Buttersäure verschoben. Bei metabolischer Verwertung sind die kurzkettigen Fettsäuren in der Lage, 70-80% des Energiebedarfs der Wiederkäuer zu decken (Bines, 1982). Trotzdem sind einige Gewebe, insbesondere Euter- und Nervengewebe, auf ein großes Angebot von Glucose als Energielieferant und Synthesebaustein angewiesen (Bines, 1982). Nach Stangassinger und Peruche (1980) haben Wiederkäuer eine Glucose-Umsatzrate, die der der Monogastrier entspricht. Die folglich erforderliche verstärkte Gluconeogeneserate findet zu ca. 85% in der Leber statt. Als Bausteine hierfür dienen Propionat und glucoplastische Aminosäuren, möglicherweise auch Laktat und Glycerin (Baird, 1981).

Eine ganze Reihe von Hormonen und andere Faktoren wirken als Regulativ zur Erhaltung des Gleichgewichts von "input und output" von Glucose im Blut. Hierzu gehören Insulin und seine katabol wirksamen Gegenspieler Glucagon, Glucocorticoide, Noradrenalin und Adrenalin, aber auch Thyroxin und Wachstumshormon. Viele der bestehenden Zusammenhänge zwischen Hormonen und Metabolismus sind bis heute nur unvollständig geklärt. Dies gilt insbesondere für die Wiederkäuer.

Zu Beginn der Laktation übersteigt bei hochleistenden Milchkühen der Energiebedarf die Energieaufnahme mit der Nahrung (Baird, 1982). Glucose und Fettsäuren stellen hierbei limitierende Faktoren bei der Milchsynthese dar (Kuhn et al., 1980, Bines und Hart, 1982). Der Intermediärmetabolismus der Wiederkäuer ähnelt zu diesem Zeitpunkt einer diabetischen Situation mit gesteigerter Lipolyse, niedriger Glucose-Utilisation, reduzierter Insulin-Sekretion sowie unterschiedlichem Ausmaß an Ketogenese und Acidose (Giesecke et al., 1982). Der Blutzuckerspiegel selbst ist aufgrund der hohen Glucose-Turnover-Rate jedoch erniedrigt. Eigentlicher Diabetes mellitus hingegen ist beim Rind ein sehr selten anzutreffender Befund (Gould, 1981).

Zur Aufrechterhaltung der Homöostase bei Laktationsbeginn sind tiefgreifende metabolische Veränderungen nötig, deren Regulation in entscheidender Weise von verschiedenen Hormonen abhängt. Pathologische Erscheinungen zu diesem Zeitpunkt, wie Ketose und zu dieser Effektkette dazugehörige Fatty-Liver-Disease und Low-Milk-Fat-Syndrome haben ihre Ursache in der metabolischen Überforderung, wie verstärkter Gluconeogenese und gesteigertem Verbrauch an Körperreserven durch Lipolyse. Charakteristische Veränderungen im Blut sind neben der Zunahme an Ketonkörpern eine Konzentrationszunahme an freien Fettsäuren sowie eine Hypoglycämie und Hypoinsulinämie. Einige Autoren untersuchten deshalb Plasma-Konzentrationen der in Frage kommenden Hormone bei unterschiedlichen Laktationsstadien und Milchleistungen. Zwar wurden positive Korrelationen gefunden für Wachstumshormon (Hart et al., 1978, Bines und Hart, 1982) sowie negative für Insulin (Hove, 1974, Walsh et al., 1980) und Thyroxin (Hart et al., 1979), doch waren diese nicht immer signifikant. Deutlicher war ein positiver Zusammenhang zwischen Milchleistung und dem Verhältnis Wachstumshormon/Insulin im Blut (Hart et al., 1979, Bines und Hart, 1982).

Mit Insulin-Gaben konnte bei Wiederkäuern die Milchleistung gedrosselt werden. Dieser Effekt wurde von Guisti et al. bereits 1927 an Ziegen beobachtet und seither vielfach bestätigt (Gowen et al., 1931, Kronfeld et al., 1963, Schmidt, 1966, Rook et al., 1967). Durch gleichzeitige Gabe von Glucose jedoch blieb die Milchleistung erhalten (Kronfeld et al., 1963, Linzell, 1967). Im Gegensatz zu Milchdrüsengewebe von Ratten hatte Insulin auch bei in vitro Studien an Eutergewebe von Ziegen keinen steigernden Effekt auf den Glucose-Metabolismus (Kronfeld et al., 1963). Hieraus konnte geschlossen werden, daß der Glucose-Transport ins Euter Insulin-unabhängig erfolgte und der milchleistungssenkende Effekt über eine Senkung des Glucose-Spiegels zustande kam. Insulin leitete Glucose also in periphere Organe ab; diese stand für die Milchsekretion dann nicht mehr zur Verfügung.

Die Glucoseaufnahme ist nämlich der Hauptfaktor für die Menge der sezernierten Milch, weil Laktose darin entscheidend für den Erhalt des osmotischen Gleichgewichts zwischen Blut und Milch verantwortlich ist

(Schmidt, 1966). Bei hochlaktierenden Kühen und Ziegen beträgt die Glucoseaufnahme ins Euter 60 - 85 % oder sogar mehr der insgesamt ins Blutplasma gelangenden Glucose (Annison und Linzell, 1964, Kronfeld und Emery, 1970). Folglich trägt ein Insulin-Abfall bei der Kuh mit hoher Milchleistung auch nur zu einer sehr geringen Glucose-Einsparung im Blut bei.

Wenn Insulin auch keinen Einfluß auf den Glucose-Transport im Euter zu haben scheint, so heißt das jedoch nicht, daß diese Drüse darauf nicht angewiesen ist. Erb (1977) erarbeitete für die Euterentwicklung ein Drei-Stufen-Modell. 40 Tage ante partum entnommene Euterexplantate brauchten Insulin zum Überleben, Hydrocortisol zur Differenzierung und Prolaktin für Biosyntheseleistungen. Anhaltspunkte finden sich auch für einen Insulin-vermittelten Transport von Aminosäuren und deren Synthese bei Mäusen (Palmquist et al., 1981).

1.1.1 Der Plasma-Glucose-Spiegel beim Rind

Der Plasma-Glucose-Spiegel liegt beim Milchkalb bei ungefähr 6,4 mmol/l (Mülling, 1966) und entspricht damit den Werten von Monogastrier. Beim wiederkauenden Rind sinkt er dann auf Normwerte von 3,3 - 4,5 mmol/l. In Tabelle 1 sind Plasma-Glucose-Spiegel zusammengestellt, die vorangegangene Untersucher in der Milchleistungsherde des Lehr- und Versuchsguts Oberschleißheim in Abhängigkeit von Laktationsstadium und Milchleistung ermittelten.

Zusammenfassend seien hier einige Faktoren genannt, die Einfluß auf den Plasma-Glucose-Spiegel der Wiederkäuer haben. Phillips und Athanasiou (1978) fanden bei Verlaufsuntersuchungen über mehrere Tage an Holstein-Friesian-Kühen nur eine geringe Streuung des Glucose-Spiegels. Signifikante tageszeitliche Schwankungen bestanden nicht (ebenso Kosak, 1980). Der Glucose-Spiegel sank nur nach dem Melken kurzfristig leicht ab. Von Furtmayr (1975) konnten auch keine saisonalen Veränderungen der Plasma-Glucose gefunden werden. McClure (1977) verwies auf

Tabelle 1: Plasma-Glucose-Spiegel von Holstein-Friesian-Kühen des Lehr- und Versuchsguts Oerschleigheim in Abhängigkeit vom Laktationsstadium

Autor	Tierzahl	Laktationsstadium	Milchleistung kg/Jahr 7030	Glucose mmol/l	± SD
Furtmayr (1975)	190*	2-9 Tage p.p. 10-40 Tage p.p. 41-240 Tage p.p. 120-50 Tage a.p.		3,77 3,63 4,22 4,34	0,67 0,61 0,49 0,50
Kosak (1980)	10	a.p. 1-7 Tage p.p. 8-14 Tage p.p. 15-21 Tage p.p. 22-35 Tage p.p. 36-49 Tage p.p.	5645	3,74 3,59 3,17 3,32 3,35 3,47	0,40 0,48 0,54 0,45 0,40 0,35
Veitinger (1983)	12	12 ± 6 Tage a.p. 6 ± 2 Tage p.p. 26 ± 2 Tage p.p. 41 ± 3 Tage p.p.	6341**	3,89 3,49 3,11 3,56	0,63 0,56 0,35 0,46

* zum Teil gleiche Tiere in aufeinanderfolgenden Laktationen
 ** Vorjahresleistung

die Beeinflussbarkeit des Glucose-Spiegels durch unterschiedliche Fütterung. Bei Untersuchungen von Chase et al. (1977) und Trenkle (1978) blieb der Glucose-Spiegel nach dem Fressen unverändert oder sank sogar und stieg erst nach ca. 1 Stunde auf leicht erhöhte Werte. Futterentzug senkte den Glucose-Spiegel bei Ziegen nach 72 Stunden um ca. 5 % (Kloe, 1983) und bei laktierenden Milchkühen bis zu einer Fastenzeit von 48 Stunden (Athanasίου und Phillips, 1978). Bei andauernder Futterkarenz stieg dieser dann bei Kühen jedoch wieder.

Keine signifikante Korrelation zur Milchleistung fanden Veitinger (1982) und Jones (1982) bei relativ kleinen Stückzahlen hochlaktierender Milchkühe. Furtmayr (1975) konnte hingegen bei ca. 100 Holstein-Friesian-Kühen eine signifikante negative Korrelation zwischen 100-Tage-Milchleistung und Plasma-Glucose-Spiegel aufzeigen. Es ließ sich in metabolischen Profil-Tests größeren Umfanges von Jones et al. (1982) und Kronfeld et al. (1982) bei hochlaktierenden Holstein-Friesian-Herden keine Beziehung zwischen Milchleistung und Glucose-Spiegel aufzeigen. Für Holstein-Friesian-Kühe fanden Athanasίου und Phillips (1978) und Giesecke und Stangassinger (1982) einen gewissen Abfall der Glucose bei Einsetzen der Laktation nach dem Kalben. Für Jersey-Kühe (Blum, 1973), Brown-Swiss-Kühe (Kunz und Blum, 1980) und Deutsches Fleckvieh (Veitinger, 1983) bestand hingegen kein signifikanter Unterschied der Glucose-Spiegel vor und nach dem Kalben. Furtmayr (1975), Kosak (1980) und Vasilatos (1981) fanden kurz nach Laktationsbeginn sehr niedrige und im Laufe der Laktation wieder ansteigende Plasma-Glucose-Spiegel. Über die Gesamtdauer der Laktation konnte jedoch keine signifikante Korrelation zur Plasma-Glucose aufgezeigt werden.

Giesecke und Stangassinger (1982) und Phillips und Athanasίου (1978) werten den Plasma-Glucose-Spiegel als einen besonders gut regulierten Parameter des Stoffwechsels der Wiederkäuer. Er ist deshalb nur ein sehr unsensibler Indikator zur Charakterisierung unterschiedlicher Stoffwechsellagen, bzw. metabolischer Störungen. Eine signifikante Erniedrigung der Plasma-Glucose fanden viele Autoren nur bei erhöhten Plasma-Ketonkörper-Werten und klinischer Ketose (Hove, 1974, Kronfeld et al., 1982, Schwalm und Schulz, 1976).

1.1.2 Insulin und seine Bedeutung bei den Wiederkäuern

Seit der Entdeckung des Insulins durch Banting und Best 1921 sind in den letzten Jahrzehnten immer wieder neue und richtungsweisende Erkenntnisse über Struktur und Wirkungsweise dieses Hormons aufgedeckt worden. Meilensteine z.B. setzten Yalow und Berson, die 1960 einen Radioimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von Insulin erarbeiteten, oder Hodgkin, der 1972 die dreidimensionale Struktur von Insulin, einem "Globuloprotein in Kleinform", bestehend aus einer α -Helix und einem antiparallelen Faltblatt, verkettet über 2 Disulfidbrücken, aufgeklärt hat. Das phylogenetisch sehr alte Insulin hat bei niederen Tieren eine gegenüber dem Mensch veränderte Aminosäuresequenz und unterschiedliche biologische Aktivität. Der Mensch, das Rind und Schwein hingegen besitzen ein beinahe identisches Insulin aus 51 Aminosäuren. Rinderinsulin hat dabei ein relatives Molekulargewicht von 5564 und unterscheidet sich in nur 3 Aminosäurepositionen vom menschlichen Insulin. Beide haben annähernd die gleiche biologische Aktivität, und Affinität zu Rezeptoren und sind immunologisch nicht unterscheidbar (Starr et al. 1979). Insulin wird in den β -Zellen des Pankreas synthetisiert und zwar über längere Protein-Zwischenstufen. Prae-proinsulin mit äußerst kurzer Zerfallszeit zu Proinsulin entsteht in den Ribosomen des E.R. (Steiner, 1976). In Golgi-Vesikeln zerfällt Proinsulin in das bei Rind und Mensch 30 Aminosäuren lange C-Peptid und Insulin, das bei Anwesenheit von Zn-Ionen auskristallisiert. Bei der endogenen Insulin-Sekretion wird also zu gleichen Teilen Insulin und C-Peptid und in geringen Mengen auch Proinsulin ausgeschüttet (Steiner, 1968, Starr et al., 1979). Bovines und humanes C-Peptid unterscheiden sich jedoch immunologisch (Steiner, 1968, Kitabchi, 1970, Starr et al, 1979). Nach Levine et al. (1955) wirkt Insulin direkt an der Plasmamembran von "Target"-Zellen und ändert deren Durchlässigkeit sowie Transportmechanismen. Verschiedene intrazelluläre Effekte von Insulin, wie die Stimulation von Fett-, Glycogen- und Proteinsynthese sowie die Aktivierung von DNA-Replikation und RNA-Transcription können durch Membranveränderungen allein nicht erklärt werden. Sutherland et al. (1969) entwickelten deshalb ein Second-Messenger-Concept, das sich vom Cyclo-AMP-System unterschied, jedoch bisher nicht eindeutig identifiziert wurde. Jedenfalls wird Insulin zur Entfaltung der

Wirkung an Rezeptoren der Plasma-Membran von Ziel-Zellen gebunden. Für einzelne Zellsysteme wie Monozyten, Fettzellen und Erythrozyten sind beim Menschen diese Rezeptoren durch Untersuchungen mit ¹²⁵I-Insulin vielfältig erforscht und charakterisiert (Olefski, 1976). Auch der Abbau von Insulin findet an Rezeptoren gebunden statt, (Terris und Steiner, 1976). Nach Mirski (1964) wird ein Großteil des aus dem Pankreas sezernierten Insulins bereits in der Leber wieder abgebaut. Im Cytosol von Leber- und Muskelzellen kommen zudem Enzyme vor, die Insulin in freier Form proteolytisch abbauen können.

Die Wirkung von Insulin ist für die Wiederkäuer und Monogastrier qualitativ die gleiche. Als Kontrollhormon im Metabolismus wirkt es anabol und regelt kurzfristig Änderungen des Energiestatus (Bines und Hart, 1982). Es fördert den Membrantransport von Glucose und Aminosäuren in vielen Organen, fördert auch die Lipogenese und Proteinsynthese, wirkt hemmend auf die Lipolyse und Proteolyse sowie die Glucose-Synthese und Freisetzung in der Leber (Steiner, 1976, Bines und Hart, 1982). Beim Wiederkäuer steigt auch die Verwertung von Acetat in peripheren Organen (Bines und Hart, 1982).

Der Auslösemechanismus der Insulinausschüttung ist multifaktoriell und insbesondere bei Wiederkäuern nur ungenügend erforscht. Nach Bassett (1981) kommen 4 Faktoren prinzipiell in Frage: 1. direkt neural, 2. endocrin hormonal, 3. durch Variation der zirkulierenden Metaboliten, 4. lokale paracrine Interaktionen. Dem Plasma-Glucose-Spiegel kommt hier zumindest bei physiologischen Werten nicht die Bedeutung als Auslösereiz zu, wie beim Monogastrier. Viele Autoren untersuchten die Wirkung von intravenös und intraruminal applizierten flüchtigen Fettsäuren auf die Insulinausschüttung. Übereinstimmend stieg der Plasma-Insulin-Spiegel insbesondere nach Propionat- und Isovalerianat-Gaben in unphysiologisch hohen Dosen (Bines und Hart, 1982, Trenkle, 1978). Im Gegensatz zu Untersuchungen an Ziegen von De Jong (1982) konnten Bines und Hart (1982) auch mit intraruminal verabreichten "Cocktails" aus flüchtigen Fettsäuren in physiologischen Dosen bei Kühen deutliche Insulin-Anstiege im Blut erzielen. Chase et al. (1977) stellten einen starken Anstieg von Insulin im portalen Blut innerhalb von 2 - 4 Minuten nach Verzehrsbeginn bei Holstein-Friesian-Ochsen

fest, was auf einen nervalen Regelkreis schließen ließ. Trenkle (1971) hielt eine große Bedeutung von intestinalen Hormonen, wie Sekretin und Cholezystokinin, bei der Insulin-Steuerung für möglich. Ein festgesetzter circadianer Rhythmus schien für die Insulinausschüttung nicht zu bestehen (Trenkle, 1971).

Trenkle (1971) berechnete Verteilungsraum, Sekretionsrate und metabolische Clearance-Raten für Insulin bei gefütterten Schafen und nach Futterentzug, sowohl nach einmaliger intravenöser Injektion von Insulin, als auch für eine mit kurzkettigen Fettsäuren induzierte endogene Insulinausschüttung. Er fand einen monoexponentiellen Insulin-Abfall mit Halbwertszeiten von ca. 12 min und gab den Insulin-Verteilungsraum mit 11 - 16 % des Körpergewichts an. Hart et al. (1980) berechneten in gleicher Weise dieselben Parameter an Kühen mit hoher und niedriger Milchleistung zu verschiedenen Laktationszeiten. Sie fanden eine deutlich höhere Insulin-Sekretionsrate bei Tieren mit niedriger Milchleistung. Signifikante Unterschiede für den Insulin-Verteilungsraum (7 - 18 % des Körpergewichts) und die metabolische Clearance-Rate bestanden nur zwischen verschiedenen Laktationsstadien. Beide Parameter waren bei trockenstehenden Tieren wesentlich kleiner als zu Beginn der Laktation. Sherwin et al. (1974) fanden beim Menschen multiexponentielle Abfallskurven für exogen zugefügtes Insulin und berechneten ein 3-Kompartiment-Verteilungsraum-Modell unter steady state-Bedingungen mit Hilfe der Glucose-Clamp-Technik. Sie fanden einen gesamten Verteilungsraum von 15,7 % des Körpergewichts, was dem Inulinraum des Menschen entsprach.

In Tabelle 2 sind Plasma-Insulin-Spiegel dargestellt, die verschiedene Untersucher bei Milchkühen in Abhängigkeit von Milchleistung und Laktationsstadium fanden. Bemerkenswert war ein deutliches Absinken des Insulin-Spiegels nach dem Kalben (Blum et al., 1973, Hove, 1974, Athanasiou und Phillips, 1978, Baird, 1982, Veitinger, 1983) und ein erneutes Ansteigen im Laufe der Laktation (Vasilatos und Wangsness, 1981). Nahrungsentzug verringerte den Insulin-Spiegel (Athanasiou und Phillips, 1978, Trenkle, 1978, Truscott et al., 1983). Wie komplex die Zusammenhänge sind, verdeutlicht, daß auch Ca-Mangel und Adrenalin die

Tabelle 2: Plasma-Insulin-Spiegel bei Milchkühen in Abhängigkeit von Laktationszustand und Milchleistung

Autor	Rasse	Tier- zahl	Laktationsstadium	Milchleistung	Insulin uU/ml	+ SD
Partale(1971)	Schwarz-Bunt	18	laktierend	10-20 kg/Tag	1,8*	
			trockenstehend		2,0*	
Blum et al.(1973)	Jersey	4	21-0 Tage a.p.		47	+ 31,2
			0-21 Tage p.p.	nicht angegeben	36	+ 52,7
Frobish et al. (1977)	Milchkühe**	8	Laktationsmitte	20-30 kg/Tag	12,2	+ 3,54
Walsh et al.(1980)	Holstein-F.	86	variabel	$\bar{X}$ = 21 kg/Tag	13,5	+ 6,51
Vasilatos(1981)	Holstein-F.	5	30 Tage p.p.	$\bar{X}$ = 35,1 kg/Tag	17,3	+ 4,25
			90 Tage p.p.	$\bar{X}$ = 32,8 kg/Tag	29,3	+ 4,25
Veitinger(1983)	Holstein-F.	12	24 + 2 Tage a.p.	$\bar{X}$ = 3070 kg 100-Tage-Leistung	19,5	+ 18,4
			26 + 2 Tage p.p.		4,9	+ 2,50
	D. Fleckvieh	8	20 + 6 Tage a.p.	$\bar{X}$ = 2309 kg 100-Tage-Leistung	24,5	+ 17,9
			26 + 2 Tage p.p.		13,4	+ 6,35

* Serum-Insulin-Werte

** Rasse nicht angegeben

Insulinausschüttung hemmten; Fasten führte zu erniedrigtem Ca-Spiegel und erhöhtem Adrenalin-Spiegel (Hove, 1978). Streß durch Venenpunktion schien keinen direkten Einfluß auf die Insulinausschüttung zu haben (Johnson et al., 1976, Trenkle, 1978). Ketose ging einher mit erniedrigtem Insulin-Spiegel (Kronfeld, 1971, Hove, 1978).

1.2 Bestimmung der Insulinresistenz

"Since high production is positively correlated with the lipolytic growth hormone, but negatively correlated with the insulin level, breeding for increased production can result in selection for metabolic conditions resembling diabetes. This is a development, which in the long run would be difficult to compensate by feeding measures," schrieben Giesecke und Stangassinger 1982 über die metabolischen Grenzen von Kühen mit hoher Milchleistung.

Sinnvoll wäre es also sicher, Methoden zu entwickeln, mit denen die Neigung der Wiederkäuer zur Stoffwechselentgleisung bei hoher Leistung aufgezeigt werden könnte.

Der Effekt von Insulin auf die periphere Glucose-Aufnahme richtet das Augenmerk auf die Bedeutung dieses Hormons bei der Entwicklung von Hypoglycämie und Ketose (Hove, 1974). Entscheidend für die Wirksamkeit von Insulin ist jedoch die Ansprechbarkeit der Zielorgane, also die Insulin-Empfindlichkeit des Organismus. Möglicherweise ist es über die Züchtung insulinresistenterer Kühe möglich, bei relativ hohem Insulin-Spiegel trotzdem eine erhebliche Milchleistung zu erzielen, weil die insulinresistentere Peripherie weniger Glucose aus dem Blut eliminiert, somit dem Euter entsprechend mehr Glucose zur Verfügung steht.

Als Maß für die Glucose-Verwertung des Organismus wurden seit langem, auch an Wiederkäuern, Glucose-Toleranz-Tests durchgeführt. Diese erlaubten jedoch keine genaue Aussage über die Insulinresistenz peripherer Organe, weil sich zum einen die Abnahme der applizierten Glucose im Blut aus mehreren Faktoren - der Insulinantwort auf den Glucose-Reiz und der Insulin-Empfindlichkeit des Gewebes zusammensetzte, zum andern aber auch vielfältige und komplexe Rückkopplungsmechanismen anderer Hormone mitbeeinflusst wurden. Beim Wiederkäuer war ein Glucose-Toleranz-Test zudem nur intravenös durchzuführen, weil eine orale Glucose-Aufnahme den Glucose-Spiegel kaum erhöhte (Reid, 1958).

Shaw (1943), Bell und Jones (1945), Holmes (1951), Palmquist et al. (1981), Hove (1978) und Veitinger (1983) führten intravenöse Glucose-Toleranz-Tests (ivGTT) an Kühen durch. Sie alle fanden über weite Bereiche des Glucose-Abfalls einen monoexponentiellen Verlauf und einen Abfall bis auf subnormale Werte durch die verzögert einsetzende Anpassung der hormonalen Regulation. Unterschiede bestanden in der Glucose-Dosierung der einzelnen Untersucher, die zwischen 0,2 - 0,5 g/kg KG bzw. 0,5 - 2,5 g/kg KG^{0,75} lagen. Bell (1945) fand bei Kühen und Kloe (1982) bei Ziegen bei unterschiedlicher Glucose-Dosierung keine Unterschiede in der Halbwertszeit (HWZ) der Glucose-Elimination, trotz der sehr niedrigen Nierenschwelle von Glucose von 5 - 6 mmol/l (Bell und Jones, 1945, Holmes, 1951).

Zusammenfassend seien einige Faktoren genannt, die die Glucose-HWZ beeinflussten. Reid (1958) fand einen großen Einfluß der Fütterung auf die HWZ bei Schafen. Bei energiereichen Diäten lag sie bei 30 min, was ungefähr der Nüchtern-HWZ des Menschen entsprach. (Wichelow et al., 1974). Bei Weizenstroh-Fütterung stieg diese um das 2 1/2fache. Palmquist et al. 1981) fanden eine negative Korrelation von $r = -0,85$ für die HWZ im ivGTT und dem Fettgehalt in Form von "Protected supplement lipid" im Futter bei Kühen. Eine stark erhöhte HWZ nach Futterentzug fanden Reid (1958) für Schafe, Kloe (1983) und Beck et al. (1983) bei Zwergziegen sowie Holmes (1951) und Hove (1978) bei Kühen. Die Tageszeit hatte ebenfalls Einfluß auf die HWZ. Bei Untersuchungen von Kloe (1983) war morgens die HWZ 1 1/2fach niedriger als am Abend. Große individuelle Unterschiede bestanden hierbei jedoch zwischen den einzelnen Ziegen. Auch beim Menschen war die HWZ am Morgen niedriger (Wichelow et al., 1977).

Die Durchführung mehrerer ivGTT's direkt hintereinander, bzw. vorangegangene Glucose-Dauerbelastung erhöhte beim Menschen die Glucose-Toleranz beim zweiten und dritten Test. Kloe (1983) fand nach Glucose-Dauerbelastung zwar eine um 21 % verbesserte Glucose-Toleranz; erneute ivGTT's nach Glucose-Dauerbelastung in den folgenden Tagen ergaben jedoch wieder normale Werte für die HWZ. Bei Holmes (1951), der drei ivGTT's im Abstand von je 2 Stunden an Kühen durchführte, ließen sich keine deutlichen Unterschiede in der HWZ erkennen.

Veitinger (1983) fand bei Holstein-Friesian-Kühen eine deutliche und bei Deutschem Fleckvieh eine geringe Abnahme der HWZ zu Beginn der Laktation gegenüber Werten vor dem Kalben. Shaw (1943), Holmes (1951) und Hove (1978) belasteten ketotische Tiere mit Glucose, fanden dort allerdings keine Veränderung der Glucose-Toleranz, wenn auch die Glucose-Verlaufskurven als Ganzes teilweise erniedrigt waren. Hove (1978) berechnete bei ketotischen und gesunden Kühen die HWZ die um ein vielfaches höher als die anderer Untersucher lag. Ursache hierfür war möglicherweise die hierbei durchgeführte Glucose-Dauerbelastung und Messung des Glucose-Abfalls nach Infusionsende, oder die größere Zeitspanne, für die die HWZ der Glucose-Elimination berechnet wurde. In allen anderen Untersuchungen lagen die Halbwertszeiten meist zwischen 25 und 45 min.

Bessere Aussagen über die Insulinresistenz des peripheren Gewebes ließen sich machen, wenn zusätzlich zur Glucose-Elimination die Insulinantwort auf den Glucose-Reiz untersucht wurde. Hierbei ergaben sich übereinstimmend ein- bis mehrgipflige Verlaufskurven (Hove, 1978, Palmquist et al., 1981, Veitinger, 1983). Plasma-Maximalspiegel wurden 15 - 20 min nach Injektionsende erreicht. Eine Normalisierung des Insulin-Spiegels stellte sich nach ca. 1 h ein.

Palmquist et al. (1981) schlossen aus einer erniedrigten Glucose-Toleranz bei gleichzeitig erhöhter Insulinantwort bei Kühen, die mit fettreichen Rationen gefüttert wurden, auf eine periphere Insulinresistenz. Die Nüchtern-Insulin-Spiegel waren bei diesen Kühen erniedrigt. Veitinger (1983) fand zu Beginn der Laktation neben erniedrigten Plasma-Insulin-Spiegeln eine verbesserte Glucose-Toleranz bei gleichzeitig erniedrigten Insulinantwort-Kurven. Hove (1978) fand bei ketotischen Tieren bei normalem ivGTT-Verlauf erniedrigte Insulin-Kurven und nach Futterentzug erniedrigte Insulinantworten bei gleichzeitig erniedrigter Glucose-Toleranz.

Durch Widerspiegelung unphysiologischer Bedingungen sowie die Schwierigkeit, die oft unregelmäßig verlaufenden Insulinantwort-Kurven meßbar zu objektivieren, kann diesen Untersuchungen nur eine bedingte Bedeutung zur Ermittlung der Insulinresistenz beigemessen werden.

Tests zu deren Bestimmung wurden in der letzten Zeit aus der Humanmedizin vorgestellt. Zum einen konnten mit in vitro Studien an unterschiedlichen Zellarten wie Monocyten, Fettzellen und Erythrocyten Bindungseigenschaften und Zahl von Insulin-Rezeptoren bestimmt werden (Bar et al., 1976, Olefski, 1976, Koltermann et al., 1979), die somit Aussagen über die Insulin-Empfindlichkeit der entsprechenden Zellen erlaubten. Zum andern wurden in den letzten Jahren in vivo Tests zur Bestimmung der Insulinresistenz der gesamten Organperipherie vorgestellt. 1974 erarbeiteten Olefski et al. einen Insulin-Suppressions-Test und nutzte dabei die Möglichkeit, mit Adrenergica die endogene Insulinausschüttung zu hemmen. In einer Dauerinfusion wurden $6 \text{ mg} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Glucose, $50 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1}$ Insulin, $6 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ Adrenalin und $0,8 \text{ mg} \cdot \text{min}^{-1}$ Propanolol Personen mit unterschiedlichem Fettansatz infundiert. Glucose-Plateau-Werte stellten sich nach 90 min ein und wurden zum Fettansatz korreliert. Nach einer Reduktionsdiät und Gewichtsabnahme wurden erneut Insulin-Suppressions-Tests durchgeführt. Dabei sank die Insulinresistenz, ausgedrückt als Glucose-Plateau-Wert, von $13,4 \text{ mmol/l}$ auf $8,9 \text{ mmol/l}$, also 33 %. Die Glucose-Fläche beim oralen Glucose-Toleranz-Test sank im gleichen Zeitraum um 12 %, die Insulinantwort-Fläche des Glucose-Toleranz-Tests um 37 %. Daraus schloß Olefski, daß durch eine Insulinresistenz bei Fettleibigkeit eine Hyperinsulinämie entsteht.

Ginsberg et al. führten 1975 einen gleichartigen Test bei erwachsenen Diabetikern, Patienten mit chronischer Pankreatitis und Kontrollpersonen durch. Die Glucose-Plateau-Konzentration lag bei Diabetikern mit $19,4 \text{ mmol/l}$ um ein Vielfaches höher als die vergleichsweise normalen Plateau-Werte von $5,8$ bzw. $6,7 \text{ mmol/l}$ bei Pankreatitis-Patienten und Kontrollpersonen. Erwachsene Diabetiker mit erhöhtem Plasma-Glucose-Spiegel zeigten also, mit dem Glucose-Plateau als Maß für Insulinre-

sistenz, eine starke Empfindlichkeits-Abnahme der Organ-Peripherie für Insulin.

1979 stellten De Fronzo et al. einen euglycämischen Clamp-Test zur Bestimmung der Insulinresistenz vor, der auf folgendem Prinzip beruht. In einer Dauertropf-Infusion wird Testpersonen 120 min lang Insulin infundiert, anfangs logarithmisch fallend, später in einer auf Körperoberfläche berechneten Dosis von $40 \text{ mU} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{m}^{-2}$, was zu einer Steigerung des Insulin-Spiegels bis zu einem Plasma-Plateau von ca. 100 uU/ml führt. Gleichzeitig wird Glucose in einer Weise infundiert, daß ständig ein euglycämischer Plasma-Spiegel erhalten bleibt. Die Plasma-Glucose wird in 5-minütigem Abstand kontrolliert und dient als Maß für eine ständige Steuerung der Infusionsgeschwindigkeit zur Erhaltung der Euglycämie. Nach Erreichen von Steady-state-Bedingungen entspricht die Glucose-Infusions-Rate der aufgenommenen und metabolisierten Glucose im Körpergewebe, wenn man von einem kleinen Glucose-Verteilungsraum-Korrekturfaktor absieht. Sie ist damit ein direktes Maß für die Insulinresistenz auf exogen zugeführte Glucose, weil durch Einhaltung euglycämischer Verhältnisse der Rückkopplungsmechanismus zwischen Glucose und Insulin aufgehoben ist. Gleichzeitig kann in diesem Test, unter der Voraussetzung, daß die Insulin-Gabe die endogene Insulin-Sekretion nicht beeinflusst, die metabolische Clearance-Rate für Insulin aus dem Verhältnis der Insulin-Infusions-Rate/Zunahme des Plasma-Insulins über Normal errechnet werden. Verfeinert wurde der Test durch die Einführung von "servo-controlled" Infusionsautomaten mit kontinuierlich arbeitenden Glucose-Meßeinrichtungen und Rückkopplungsschaltung zur Glucose-Infusion, die eine bessere Euglycämie garantieren (Home et al., 1982).

Von vielen Untersuchern wurde auf diese Weise der Zusammenhang zwischen Fettleibigkeit und Nüchtern-Hyperinsulinämie beim Menschen untersucht (Olefski et al., 1974 u.1976, De Fronzo et al., 1978, Koltermann et al., 1979). De Fronzo sah in der Fettleibigkeit die häufigste Ursache für Insulinresistenz, die einherging mit Hyperinsulinämie und gesteigerter Insulinantwort auf den Glucose-Toleranz-Test.

Olefski (1976) fand beim Menschen auch eine gesteigerte Insulinresistenz nach 3 - 14 Fastentagen. Diese ging jedoch im Gegensatz zu den Verhältnissen bei Fettleibigkeit nicht mit einer Verringerung der Bindung von Insulin an Monocyten in vitro einher. Hieraus schloß er auf eine Post-Rezeptor-Ursache für die gesteigerte Insulinresistenz beim Fasten. Greenfield et al., (1981) verglichen in einer Studie De Fronzo's euglycämischen Clamp-Test mit dem Insulin-Suppressions-Test von Olefski und fanden übereinstimmende Ergebnisse für beide Tests. Der Insulin-Suppressions-Test hatte den Vorteil der einfacheren Anwendung und den Nachteil, daß potente Drogen appliziert werden mussten, die ihrerseits wieder Einfluß auf den Kohlenhydratstoffwechsel haben konnten. Der Glucose-Clamp-Test hingegen hatte den Nachteil, daß eine Regulierung der Euglycämie an der oberen bzw. unteren Grenze beachtliche Unterschiede in der Glucose-Infusions-Rate bewirkte.

1.3 Problemstellung

Nachdem von Veitinger (1983) bei Kühen nach dem Kalben erniedrigte Plasma-Insulin-Spiegel gefunden wurden, die in das Bild einer diabetes-ähnlichen Stoffwechsellage passten, stellte sich die Frage nach der Relevanz dieses Befundes. Natürlich hängt der Wirkungsgrad von Insulin nicht einzig von dessen Konzentration im Blut ab, sondern wird in entscheidender Weise von der Zahl und Affinität spezifischer Rezeptoren in den Zielorganen beeinflusst. Aus Arbeiten an Menschen (Olefski, 1976, Koltermann et.al., 1979) und Labortieren lassen sich häufig kompensatorische Beziehungen zwischen dem Plasma-Insulin und den Rezeptoren ableiten. Bei Kühen wäre so eine Kompensation der Hypoinsulinämie vorstellbar. Neben Untersuchungen an Insulin-Rezeptoren von Erythrozyten von Kühen zur Abkalbezeit (Ertl, 1983, Beck et al. 1983), die möglicherweise nicht für alle insulinabhängigen Organe repräsentativ sein dürften, sollte in der vorliegenden Arbeit ein in vivo anwendbarer Test zur Bestimmung der Insulinresistenz bei Kühen entwickelt werden. Einleitende Versuche an Zwergziegen (Beck et al., 1983) ließen es auch für das Rind als aussichtsreich erscheinen, die

Insulinresistenz mit Hilfe der Glucose-Clamp-Technik zu bestimmen. Der Glucose-Clamp-Test wurde morgens und abends bei Kühen mit unterschiedlicher Leistung und unterschiedlichem Fettansatz durchgeführt, um eventuelle Einflüsse aufzuzeigen. Desweiteren sollte er mit anderen Parametern des Kohlenhydrat-Metabolismus, den basalen Plasma-Spiegeln von Glucose und Insulin, dem ivGTT und der dazugehörenden Insulinantwort verglichen werden. In einer vorangegangenen Arbeit von Veitinger (1983) konnten keine signifikanten Korrelationen zwischen Glucose-Toleranz, Insulinantwort und der Milchleistung gefunden werden. Deshalb sollte ein möglicher Einfluß des Fettansatzes der Tiere auf den ivGTT untersucht werden, zumal beim Menschen Adipositas die Glucose-Toleranz und in noch größerem Maße die Insulinresistenz beeinflussen.

Neben einer subjektiven Einteilung in fette und normale Tiere wurden Inulin-Verteilungsräume als Maß für das Extrazellulärvolumen bestimmt, weil ein positiver Zusammenhang zwischen Extrazellulärvolumen und Fettansatz vermutet wurde.

Sollte der Glucose-Clamp-Test geeignet sein, den Kohlenhydrat-Stoffwechsel der Milchkuh genauer zu charakterisieren, könnte er als Maß für die metabolische Gesundheit und Leistungsfähigkeit benutzt werden und hier auch praktische Anwendung finden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere, Haltung und Fütterung

Als Versuchstiere standen 9 Kühe und ein Rind der Rasse Holstein-Friesian aus dem Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim zur Verfügung. Alle Kühe stammten aus der dortigen Hochleistungsherde und waren zum Versuchszeitpunkt zum Abmelken in einem Mehrzweckstall mit Mittellangstand und Grabner-Ketten-Anbindehaltung aufgestellt. Alle Tiere befanden sich bei Versuchsbeginn schon mehrere Monate in dem Stall.

Die Fütterung der Tiere bestand aus einer Basisration von 19 kg Maissilage, 14 kg Grassilage und 3 kg Heu pro Tier und Tag. Dabei wurde die Silage morgens nach dem Melken zugeteilt und stand den Kühen dann den ganzen Tag über zur freien Aufnahme zur Verfügung. Die Heurration wurde abends gegen 18 Uhr verteilt und wurde von den Tieren im Laufe der Nacht aufgenommen. Alle Tiere erhielten außerdem ca. 20 g bergophor-Mineralfutter täglich. Diese Ration entsprach dem Grundumsatzbedarf zuzüglich dem Energiebedarf für 13 kg Milch sowie dem Eiweißbedarf für 10 kg Milch täglich. Deshalb wurde Kühen mit einer Milchleistung von über 12 kg zusätzlich 0,75 kg einer Ausgleichsration, bestehend aus je 29,5 % Hafer, Leinsaat und Gerste sowie 11,5 % Mineralfutter verabreicht. Kühe mit über 15 kg Milchleistung erhielten für je 2,4 kg Milchmehrleistung 1 kg pelletiertes Milchleistungsfutter. Kraftfutter und Ausgleichsfutter wurden während der Melkzeiten gefüttert. Dieser Futterplan wurde auch während der Versuche an den einzelnen Tieren eingehalten. Während der Versuche wurden die Tiere mit 2 Kopfhaltern ausgebudet, hatten jedoch genügend Spielraum zur freien Futter- und Wasseraufnahme. Gemolken wurden die Kühe zwischen 5.15h und 6.15h morgens und zwischen 15.30h und 16.30h abends.

Zum Vergleich von Tieren mit unterschiedlichem Fettansatz wurden für die Versuche nach subjektiv optischen Gesichtspunkten 5 normalgewichtige und 5 fette Tiere ausgesucht. Keines der Tiere war trächtig. Die Versuchstiere und deren Körpermaße sind, nach Kondition und Milchleistung geordnet, in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Versuchstiere, Körpermaße und tägliche Milchleistung

Kuh Nr.	Milch	Kondition	Körpergew.	Brustumf.	Widerristhöhe
	in kg/d		in kg	in cm	in cm
764	0	fett	680	215	138
210	0	fett	700	217	131
775	0	fett	840	230	141
696	8,0	fett	700	224	135
674	8,0	fett	760	216	134
746	8,0	normal	600	200	133
842	8,0	normal	580	198	138
836	14,5	normal	600	196	134
857	15,5	normal	520	191	131
846	18,0	normal	580	196	138

2.2 Versuchszeitplan

Alle Versuche wurden zwischen dem 13.12.1982 und dem 3.5.1983 durchgeführt. Zu den einzelnen Versuchen wurden die Kühe jeweils paarweise herangezogen. Das erste Paar diente zur Erarbeitung der Methode. Zur Überprüfung des individuellen Streubereichs wurden bei diesen beiden Kühen mehrere Glucose-Belastungsversuche durchgeführt. Zwischen 2 Glucose-Clamp-Tests lag immer ein Zeitraum von 2 Wochen. Die intravenösen Glucose-Toleranz-Tests (ivGTT's) wurden in der Regel einen Tag vor einem Glucose-Clamp-Test (GCT) durchgeführt.

Für die 8 anderen Kühe ergab sich folgender Versuchsablauf. Am ersten Versuchstag wurde ein zentraler Venenkatheter gelegt und am Morgen um 9.30h sowie am Abend um 16.00h ein ivGTT durchgeführt. Die ivGTT's wurden mit einer Inulin-Injektion zur Bestimmung des Inulinraumes kombiniert. Am zweiten Versuchstag wurde dann um 16.00h ein zweiter Venenkatheter gelegt und anschließend ein 4 1/2 h dauernder Glucose-Clamp-Test (GCT) durchgeführt. Nach 2 Wochen Pause wurden erneut Katheter gelegt und morgens um 9.00h ein GCT durchgeführt.

2.3 Glucose-Clamp-Test

In Anlehnung an Arbeiten von De Fronzo (1979) wurde ein für den Wiederkäuer und an Stallverhältnisse angepaßter Stoffwechseltest mit gleichem Wirkungsmechanismus erarbeitet und ebenso als Glucose-Clamp-Test (GCT) benannt (Beck et al. 1983). Im folgenden soll das Prinzip des Tests kurz umrissen werden. Zwischen Blut-Glucose und Insulinausschüttung ins Blut besteht eine positive Kopplung: Eine erhöhte Konzentration von Glucose im Blut führt zu erhöhtem Insulin-Spiegel. Dieser wiederum fördert den Glucose-Transport in alle Insulinempfindlichen Zellen und erniedrigt dadurch den Plasma-Glucose-Spiegel. So reagiert der Organismus bei exogener Glucose-Zufuhr in Glucose-Toleranz-Tests mit einer Insulin-Anstiegskurve im Blut. Für die Geschwindigkeit der Glucose-Normalisierung im Blut ist jedoch nicht allein die Größe der Insulinantwort entscheidend, sondern in

gleichem Maße auch die unterschiedliche Sensitivität der peripheren Organe für Insulin. Beide Effekte lassen sich im ivGTT nicht unterscheiden. Um die Insulin-Sensitivität des Organismus allein in vivo messen zu können, wurde den Kühen Insulin und Glucose gleichzeitig infundiert, und zwar in einem Dosisverhältnis, das nach einer Stabilisierungsphase von 3 h zu einer Gleichgewichtsphase mit euglycämischem Glucose-Spiegel führen sollte. Die Konzentration des Plasma-Insulin-Plateaus sollte dabei auf einer Höhe liegen, wie sie physiologischerweise auch als Maximalwert bei der Insulinantwort nach exogener Glucose-Zufuhr vorkam. Unter der Voraussetzung, daß das Glucose-Plateau im physiologischen Bereich des Plasma-Glucose-Spiegels lag, konnte davon ausgegangen werden, daß der endogene Insulin-Stoffwechsel in keiner, oder aber nur in geringer Weise, beeinflusst war. Die im Bereich von 200 - 270 min ermittelten Glucose-Werte wurden zu einem Plateau-Wert gemittelt. Diese Plateau-Konzentration wurde als Maß für die Insulin-Empfindlichkeit der Gewebe gewertet. Bei niederem Glucose-Plateau besaß der Organismus eine hohe Sensitivität für injiziertes Insulin. Umgekehrt ließ eine hohe Glucose-Plateau-Konzentration auf eine erhöhte Insulinresistenz schließen, die für den verminderten Glucose-Transport aus dem Blut verantwortlich war. Die Dosierungen und Methodik des Tests wurden an Zwergziegen erarbeitet (Beck et al., 1983) und konnten auf das Rind übertragen werden.

Vor Beginn des GCI's wurden beidseitig Katheter in die Vv. jugulares gelegt, die dann mit Haftband und einem Verlängerungsstück an der seitlichen Halswand fixiert wurden. Anschließend wurde den Tieren über Druckpumpen (Braun-Infusomat, Type 870202) aus Plastik-Infusionsflaschen mit Infusomat-Leitungen (Braun-Melsungen) 4 1/2 h lang Glucose-Lösung, 400g/l, (G40% - salvia, Homburg) mit Insulin-Zusatz (Alt-Insulin vom Rind, Hoechst, 40 I.E./ml) infundiert. Die Dosis wurde auf das metabolische Körpergewicht bezogen und betrug für:

$$\text{Glucose: } 6,88 \text{ mg} \cdot \text{kg} \text{ KG}^{-(0,75)} \cdot \text{min}^{-1} *$$

$$\text{Insulin: } 3,44 \text{ mU} \cdot \text{kg} \text{ KG}^{-(0,75)} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$* \hat{=} 0,382 \text{ mmol} \cdot \text{kg} \text{ KG}^{-(0,75)} \cdot \text{min}^{-1}$$

Die Mischinfusion wurde für 5 h angesetzt. Ihr wurden zudem 10 ml Eigenblut zugesetzt, um eine Bindung des Insulins an die Wände des Infusionssystems zu verhindern (Wiseman, 1961). Die Dosierung erfolgte dann über die Infusomat-Druckpumpen mit einstellbarer Tropfgeschwindigkeit in ml/h. Die genaue Dosierung bei den einzelnen Tieren ist aus Tabelle 4 ersichtlich. Vor Beginn der jeweiligen Versuche wurden die Pumpen geeicht.

Tabelle 4: Dosierungsangaben für die Inulinraumbestimmung, den intravenösen Glucose-Toleranz-Test und den Glucose-Clamp-Test

Kuh Nr.	Körpergew. in kg	Inulin g/Tier	Glucose-	Glucose-Clamp-Test	
			Toleranz-Test Glc., g/Tier	Glc., g/min	Ins., U/min
764	680	12,0	133	0,832	0,416
210	700	12,0	136	0,936	0,468
775	840	14 ,0	156	1,073	0,537
696	700	12,0	136	0,936	0,468
674	760	13,0	145	0,996	0,498
746	600	11,0	121	0,832	0,416
842	580	10,5	118	0,813	0,406
836	600	11,0	121	0,832	0,416
857	520	10,0	109	0,749	0,372
846	580	10,5	118	0,813	0,406

Blutproben wurden vor Beginn der Infusion sowie in 10 minütigem Abstand im Zeitraum von 180 - 270 min nach Beginn der Infusion aus dem noch freien Venenkatheter entnommen. In allen Proben wurde der Glucose-Gehalt bestimmt. In der Probe vor Infusionsbeginn sowie in den Proben von 240 - 270 min wurde auch der Insulin-Gehalt bestimmt. Abbildung 1 veranschaulicht schematisch die Versuchsanordnung.

Glucose-Plateau-Werte wurden berechnet als arithmetisches Mittel der Proben 200 - 270 min. Als Streuungsmaß für den Plateau-Wert diente der Variationskoeffizient; dieser lag im Mittel bei 3,4 %. Insulin-Plateau-Werte wurden aus den Werten von 240 - 270 min berechnet. Der Variationskoeffizient betrug dabei im Mittel 8,2 %. Metabolische Clearance-Raten (MCR) wurden für Insulin mit folgender Formel bestimmt (De Fronzo, 1979):

$$\text{MCR (ml} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\text{Insulin-Infusionsrate (U} \cdot \text{min}^{-1}) \cdot 10^6}{\text{Insulin-Plateau - Basales Plasma-Insulin (uU} \cdot \text{ml}^{-1})}$$

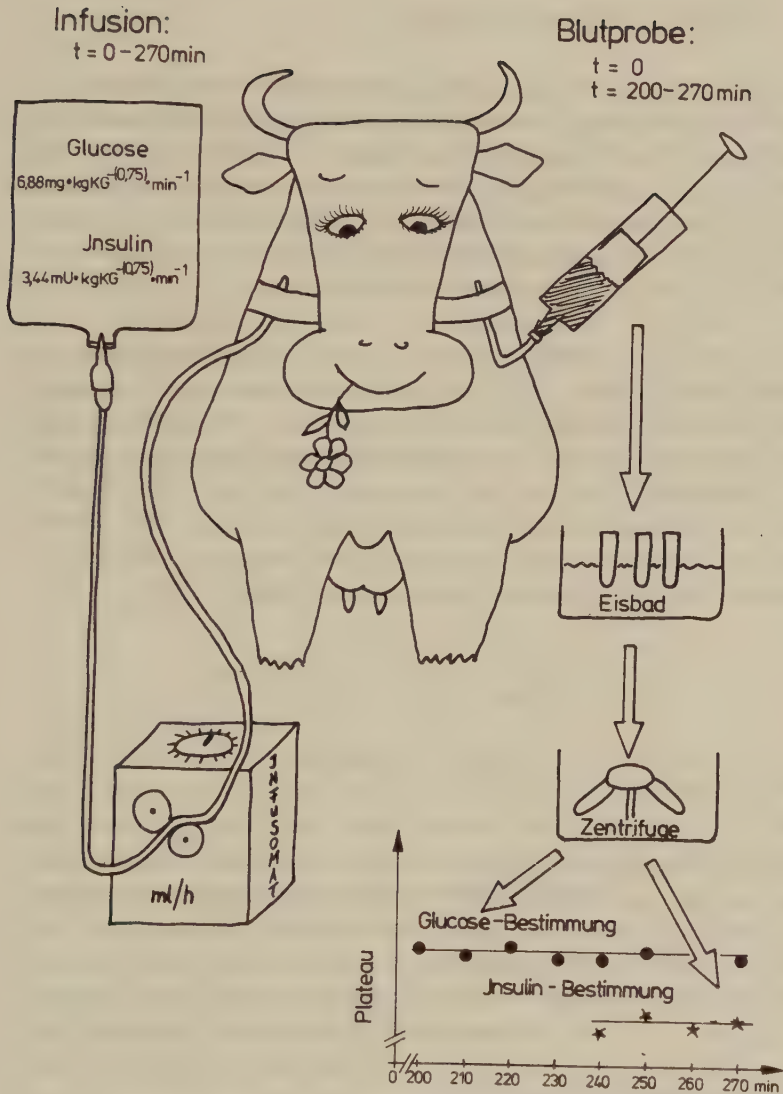


Abb.1: Schematische Darstellung der Versuchsanordnung für den Glucose-Clamp-Test.

2.4 Intravenöser Glucose-Toleranz-Test

An allen Tieren wurde mindestens je ein intravenöser Glucose-Toleranz-Test (ivGTT) am Morgen und am Abend des gleichen Tages durchgeführt. Dabei wurde ihnen innerhalb 3 min mittels 20 ml Einwegspritzen (DIN 13098, Luer, Braun-Melsungen) durch einen morgens in die V. jugularis gelegten und fixierten Venenkatheter (Hemocath, Luer-Lock, Fa. Vygon, Aachen) mit Verlängerungsstück (Fa. Vygon) eine Glucose-Lösung, 400g/l (G40%, salvia-Werk, Homburg/Saar) injiziert.

Die Dosis wurde nach dem metabolischen Körpergewicht berechnet und betrug $1 \text{ g Glc.} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{KG}^{-(0,75)}$. Blutproben wurden vor Beginn der Injektion sowie 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80 min nach Injektionsende gewonnen. Die erhaltenen Plasma-Glucose-Werte wurden dann halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Die für den Bereich von 10 bis 40 min berechnete lineare Funktion erlaubte es, für diesen Zeitraum die Halbwertszeit (HWZ) sowie die Eliminationskonstante k zu ermitteln. Dies erfolgte nach folgender Formel (Kaneko, 1980):

$$k \left(\min^{-1} \right) = \frac{1}{d(t)} \cdot 2,303 \cdot d(\log y)^*$$

$$\text{HWZ (min)} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k}$$

Außerdem wurde bei den ivGTT's am Morgen zwischen 5 und 60 min nach Ende der Glucose-Injektion die Plasma-Insulin-Konzentration gemessen und diese Insulinantwort graphisch aufgezeichnet sowie die Fläche der Insulinantwort über dem Normalwert, mittels Aufteilung in Trapez- und Dreieckflächen, zwischen 0 und 60 min bestimmt. Für die Zeit zwischen 20 und 60 min wurde die Neigung des Insulin-Abfalls berechnet. Für die Zeit zwischen 10 und 60 min wurde der Insulin-Abfall mit dem Glucose-Abfall korreliert.

* $d(\log y)$ = Differenz zweier logarithmierter Plasma-Glucose-Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

2.5 Inulinraum

Die Messungen des Inulinraums erfolgten gleichzeitig mit den ivGTT's. Hierzu wurde der Glucose-Injektions-Lösung Inulin in einer Dosierung von $0,089 \text{ g} \cdot \text{kg KG}^{-(0,75)}$ zugesetzt und unter vorsichtigem Erwärmen darin gelöst. Das Inulin wurde dann zusammen mit der Glucose beim ivGTT innerhalb 3 min i.v. injiziert. Blutproben wurden bis 40 min nach Injektionsende in 5 minütigem Abstand genommen, danach bis 120 min in 10 minütigem Abstand. Bei den meisten Kühen wurde zudem ein 140 min-Wert und ein 160 min-Wert genommen. Die erhaltenen Plasma-Inulin-Konzentrationen wurden in Dosis $\% / 1 \text{ Plasma}^*$ berechnet. Bei graphischer Aufzeichnung gegen die Zeit ergab sich ein multiexponentieller Verlauf der Inulinkurven. Nach Laadegård-Pederson (1972) ließ sich das Extracellulärvolumen (ECV) folgendermaßen berechnen:

$$\text{ECV} = Q \cdot \frac{\int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot d(t)}{\left(\int_0^{\infty} t \cdot c(t) \cdot d(t) \right)^2}$$

wobei Q die injizierte Menge Inulin in mg war, t die Zeit in Minuten, c(t) die Inulin-Konzentration zum Zeitpunkt t in mg/ml, ECV das Extracellulärvolumen in ml. Nach Loensmann-Poulsen (1977) ließ sich der Abfall des Plasma-Inulins durch eine definierte Zahl von Exponentialfunktionen mit folgender Formel charakterisieren:

$$c(t) = c_i \cdot e^{-b_i \cdot t}$$

* der Ausdruck mußte für das verwendete Computerprogramm eingesetzt werden

Somit galt für das Extracellulärvolumen (ECV):

$$ECV (l) = \frac{\frac{c_i \cdot 100}{k_i^2}}{\left(\frac{c_i}{k_i} \right)^2}$$

wobei c_i die t(0)-Konzentration der Einzelkurven in Dosis % /l Plasma und k_i die Eliminationskonstante der Einzelkurven war. Die Anfangskonzentrationen c_i und Konstanten k_i wurden von Hand mit Hilfe der Abschälmethode (peeling off-technique) berechnet. Abb. 2 zeigt das Beispiel einer abgeschälten Kurve.

Um die einzelnen Kühe besser vergleichen zu können und Unterschiede zwischen fetten und mageren Tieren in der Größe des ECV herauszufinden, wurde der Inulinraum auf das Körpergewicht bezogen und in ml/kg KG ausgedrückt. Für einige Inulinkurven wurde zudem mit Hilfe eines Computerprogramms* ein 3-Kompartiment-Modell erstellt.

* Dank gilt der Firma Thomae, Biberach für Bereitstellung des Computers und Herrn Dr. Stangassinger für die Berechnung der Kompartimente

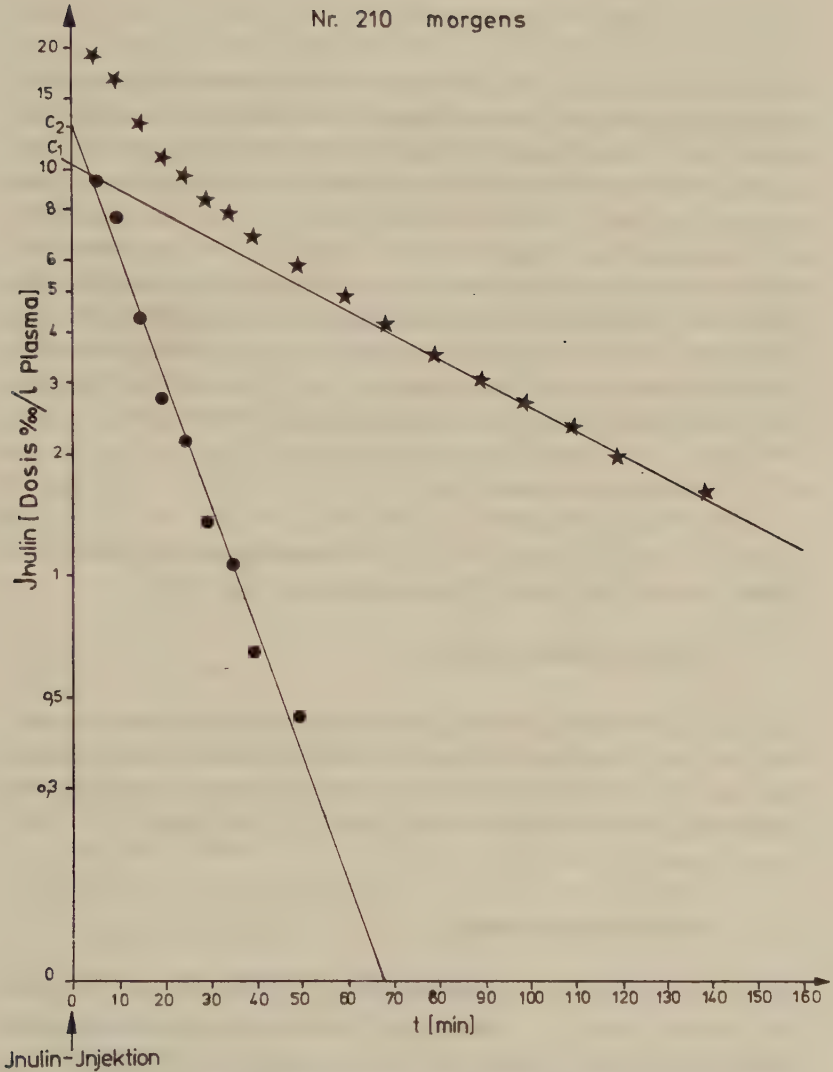


Abb.2: Inulinabfall im Plasma in semilogarithmischer Auftragung zur Bestimmung des Inulinraums
 ★ = Inulinkonzentration
 ● = Differenz zur monoexponentiellen Endgeraden
 c_1, c_2 = extrapolierte t_0 -Konzentrationen.

2.6 Probengewinnung

Sämtliche Proben wurden über einen zentralen Venenkatheter in heparinisierte Monovetten (Sarstedt, Nümbrecht) aspiriert. Vor Entnahme der eigentlichen Probe wurden in einer zweiten Monovette die ersten 2 ml des Aspirats verworfen. Direkt nach Gewinnung der Blutproben wurde der Venenkatheter mit 3 ml eines Gerinnungshemmers (35 g/l Natriumcitrat, Fa. Fresenius, Bad Homburg) gespült. Nach der Entnahme wurden die Proben sofort in ein Eisbad gestellt. Nach Versuchsende wurden die Proben im Labor sofort mit 1.500 g 10 min lang zentrifugiert und enteiweißt. Die Glucose-Bestimmungen wurden noch am selben Tag, die Inulin-Bestimmungen am darauffolgenden Tag durchgeführt. Für die Insulin-Bestimmung wurde das Blutplasma bei -18°C aufbewahrt.

2.7 Analytische Methoden

Für die Glucose-Bestimmung sowie die Inulin-Bestimmung wurde das Plasma 1:11 mit TCA, 50 g/l (Trichloressigsäure) enteiweißt.

2.7.1 Plasma-Glucose-Bestimmung

Glucose-Konzentrationen wurden enzymatisch in einem Glucose-Oxidase-Test (GOD-Perid-Test Kombination, Boehringer, Mannheim) nach Anleitung bestimmt. Vor Beginn der Analysen wurde eine Eichkurve mit $r=0,9996$ aufgestellt. Die Wiederfindung von Glucose im Plasma betrug 99,4 % mit einem Streubereich von 2,1 %.

2.7.2 Plasma-Inulin-Bestimmung

Inulin wurde mit Hilfe der Anthron-Methode, modifiziert nach Davidson und Sachner (1963) in Anlehnung an Boehncke (1971), folgendermaßen bestimmt. Nach 10 minütigem Zentrifugieren des TCA-Plasma-Gemisches wurden 200 μl des enteiweißten Überstandes mit 2 ml Anthron-Reagenz versetzt. Die Reaktionsansätze wurden geschüttelt und 50 min bei 38°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Proben kurz im Eisbad abgekühlt und bei Raumtemperatur die Extinktion bei 644 nm im Photometer (Beckmann, Modell 24) gemessen. Als Standard wurde eine Lösung

mit 35 mg Inulin/l TCA benutzt. Vor Beginn der Analysen wurde eine Eichkurve mit $r=0,996$ aufgestellt. Bei 12 Einzelmessungen von 61,5 mg Inulin/l betrug der Variationskoeffizient 0,73 %. Anthron-Reagenz wurde jeweils frisch für die Analysen hergestellt. Dazu wurde 500 ml konz. Schwefelsäure (950 -970 g/l, Merck, Darmstadt) mit 160 ml Aqua dest. vorsichtig gemischt und nach Abkühlung darin 500 mg Anthron (Merck) gelöst.

Auch verschiedene Glucose-Konzentrationen in TCA verursachten bei dieser Methode konzentrationsabhängig eine Extinktion. Eine im Bereich von 0 - 44,44 mmol/l Glucose aufgestellte Eichkurve hatte eine Steigung von $0,003 \text{ mmol}^{-1}$ ($r=0,990$) bei einer Inulin-Standard-Extinktion von $E=0,250$. Die Streuung der Einzelwerte bei der Dreifachbestimmung war gering. Auch Plasma allein wies, nach Abzug der durch den Glucose-Gehalt bedingten Extinktion, noch eine geringe Extinktion auf. Deswegen wurde folgende Formel zur Berechnung des Inulin-Gehalts in den einzelnen Proben aufgestellt:

$$In = (E_t - E_o - 3,06 \cdot 10^{-3} \cdot (Glc_t - Glc_o) \cdot \frac{E_s}{0,25}) \cdot 11 \cdot \frac{35}{E_s}$$

In=Inulinkonzentration in mg/l

E_t = Gemessene Extinktion der Probe

E_o = Gemessene Extinktion der O-Probe

0,0036 = Faktor für Glucose-Abzug

Glc_t = Glucose-Konzentration in der Probe in mmol/l

Glc_o = Glucose-Konzentration der O-Probe

E_s = Inulin-Standard-Extinktion

$\frac{E_s}{0,25}$ = Wichtung des Glucose-Abzugs (Beziehung zur jeweiligen Inulin-Standard-Extinktion)

11 = Verdünnungsfaktor durch Enteiweißung

35 = Standard-Konzentration in mg/l

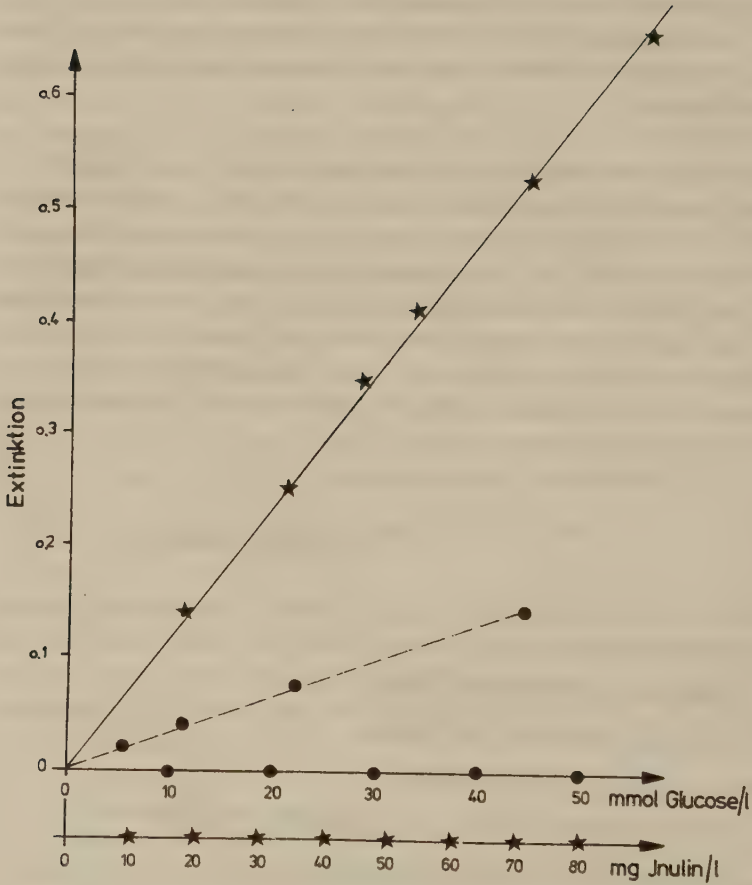
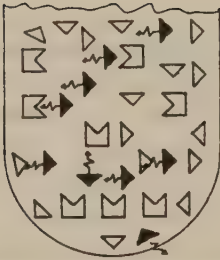


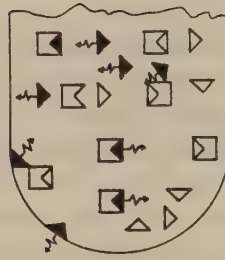
Abb.3: Extinktionsgerade verschiedener Verdünnungen von Glucose und Inulin in TCA, 50g/l, bei der Anthronmethode.
● : Glucose
★ : Inulin

2.7.3 Plasma-Insulin-Bestimmung

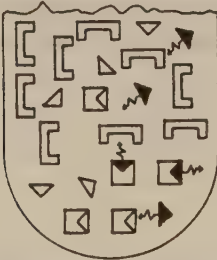
Die Insulin-Bestimmungen wurden mit einem Insulin-Radioimmunassay-Kit "Insik 5" (Isotopendienst West, Dreieich bei Frankfurt/Main) durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests geht aus Abb. 4 hervor. Ausgewertet wurden die Ansätze mit einem programmierbaren gamma-Zähler (Packard, Auto gamma 500), der über eine selbsterstellte Eichkurve und die Impulsrate der Proben den Insulingehalt in uU/ml berechnete. Die Kreuzreaktion des Tests mit Rinderinsulin betrug 100 %. Zu Beginn der Analysen wurde für den Test eine Wiederfindung bestimmt, die bei einem Zusatz von 25 uU/ml Insulin zu einem Kontrollserum 111 % betrug. Der Variationskoeffizient betrug 6,32 % bei 8 gemessenen Werten und lag damit in einem Bereich den Walsh et al. (1980) bei Insulin-Bestimmungen an Kühen fanden. Abb. 5 zeigt das Beispiel einer Insulin-Eichkurve.



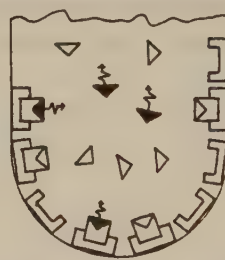
1. Probe mit unbekanntem Gehalt an Insulin: $\triangle$ wird mit definierten Mengen von ^{125}J -Insulin: $\blacktriangle$ und Insulin-Antikörpern: M gemischt.



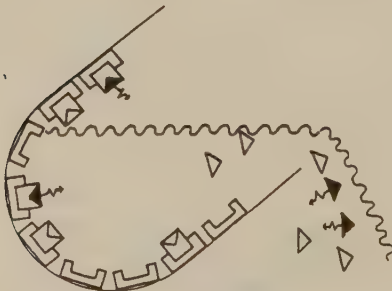
2. Dann wird 1 1/2 h bei Zimmertemp. inkubiert. Insulin und ^{125}J -Insulin konkurrieren kompetitiv um die Bindung am Antikörper.



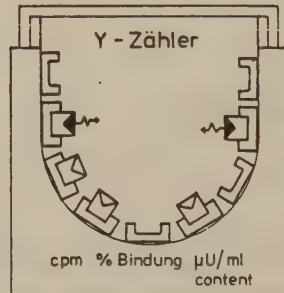
3. Präzipitierende Anti-Globulin-Antikörper: U in Pufferlsg. werden im Überschuß dazugegeben, danach 15 min inkubiert.



4. Nach 15 min Zentrifugieren haften die Antigen-Antikörper-Komplexe: U durch Präzipitation an der Röhrchenwand.



5. Der Überstand wird mit dem verbleibenden Insulin und ^{125}J -Insulin dekantiert.



6. Im Y-Zähler wird die Impulsrate gezählt. Sie ist umso niedriger, je mehr Insulin aus der Probe die Antikörper-Bindungsstellen besetzt.

Abb.4: Prinzip des Radioimmunassays zur Bestimmung des Insulins

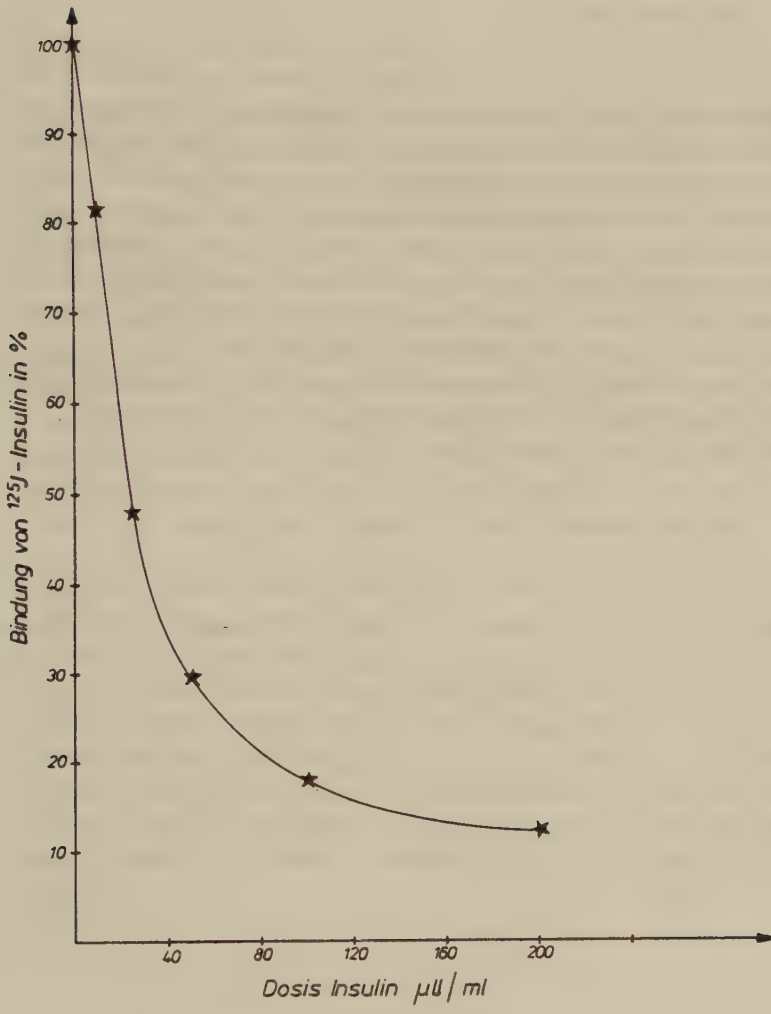


Abb. 5: Insulin-Eichkurve

2.8 Statistische Methoden

Plateau-Werte für Glucose und Insulin wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung SD als Streuungsmaß angegeben. Die Basalwerte von Glucose und Insulin wurden morgens und abends mehrmals bestimmt und als Mittelwert angegeben. Mittelwerte der einzelnen Parameter wurden für alle Tiere und einzelne Untergruppen mit der Standardabweichung SD angegeben. Einzelne Parameter wurden linear miteinander korreliert und Regressionskoeffizienten b und Korrelationskoeffizienten r berechnet. Signifikanzniveaus dieser Korrelationen wurden in Tabellen abgelesen (Diem, K. u. C. Leitner: Wissenschaftliche Tabellen, S.61).

Zum Vergleich der Mittelwerte von Tiergruppen wurde mit dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test das Signifikanz-Niveau berechnet (nach Sachs, L., Statistische Auswertungsmethoden).

3 Ergebnisse

3.1 Basaler Plasma-Glucose-Spiegel

Vor Beginn der Glucose-Toleranz-Tests (ivGTT) bzw. Glucose-Clamp-Tests (GCT) wurden jeweils morgens und abends basale Plasma-Glucose-Spiegel bestimmt. In Tabelle 5 sind die gemittelten Werte der einzelnen Kühe morgens und abends sowie Gruppenmittelwerte aufgeführt. Bei den Kühen 674 und 746 wurde morgens an 5 Tagen der basale Plasma-Glucose-Spiegel bestimmt. Die als SD berechnete Streuung dieser Werte ist ebenfalls in Tabelle 5 ersichtlich. Auffallend waren erheblich erniedrigte Plasma-Glucose-Spiegel ($2,8-3,0$ mmol/l) bei den Kühen 764, 696 und 846 an dem Abend des Tages, an dem morgens ein ivGTT durchgeführt wurde. Die Plasma-Insulin-Spiegel bei derselben Messung waren jeweils unauffällig. Eine Beeinflussung durch die vorangegangene Glucose-Belastung konnte hier nicht ausgeschlossen werden. Bei allen anderen Tieren war die Streuung von Plasma-Glucose-Spiegeln zur selben Tageszeit gering.

Der mittlere Plasma-Glucose-Spiegel aller Kühe lag bei $3,88 \pm 0,22$ mmol/l. Morgens lag der Mittelwert bei $4,03 \pm 0,16$ mmol/l und damit signifikant ($p < 0,005$) über dem der Abendmessungen von $3,74 \pm 0,25$ mmol/l. Keine signifikanten Unterschiede der Mittelwerte zeigten Untergruppen der Kühe. Der Mittelwert der fetten Tiere ($3,90 \pm 0,18$ mmol/l) lag kaum über dem der normalen Gruppe ($3,87 \pm 0,11$ mmol/l). Der Mittelwert lag bei trockenstehenden fetten Tiere geringgradig höher, als bei milchleistenden fetten Tiere. Keine signifikanten Korrelationen des basalen Plasma-Glucose-Spiegels bestanden zur Milchleistung und zum Körpergewicht.

Tabelle 5: Basaler Plasma-Glucose-Spiegel

Kuh Nr.	Milch kg/d	Kondition	Glucose		$\bar{X} \pm SD$
			morgens mmol/l	abends	
764	0	fett	4,25*	3,56*	fett: $3,90 \pm 0,18$
210	0	fett	3,76	3,88	
775	0	fett	4,28	3,96	
696	8,0	fett	3,81	3,50	
674	8,0	fett	$4,10 \pm 0,25^{**}$	3,94	normal: $3,87 \pm 0,11$
746	8,0	normal	$4,04 \pm 0,25^{**}$	3,81	
842	8,0	normal	3,99	3,72	
836	14,5	normal	4,05	3,79	
857	15,5	normal	3,98	3,92	
846	18,0	normal	4,04	3,29	
$\bar{X} \pm SD:$			$4,03 \pm 0,16$	$3,74 \pm 0,25$	gesamt: $3,88 \pm 0,22$
$p < 0,005 \quad (n=10)$					

* Einzelbestimmungen

** Durchschnitt von 5 Einzelmessungen $\pm SD$

3.2 Basaler Plasma-Insulin-Spiegel

Ebenso wie die Glucose-Spiegel wurden die Insulin-Konzentrationen in den vor Testbeginn gewonnenen Plasma-Proben bestimmt. Die Durchschnittswerte der einzelnen Kühe morgens und abends sowie die Gruppenmittelwerte sind in Tabelle 6 zusammengefaßt. Bei den Tieren 775, 210 und 746, also 2 fetten, trockenstehenden Tieren und einer normalgewichtigen laktierenden Kuh, lagen die Plasma-Insulin-Werte deutlich über den Werten der anderen Tiere. Der Mittelwert aller Kühe betrug $32,7 \pm 23,2$ uU/ml. Zwischen den gemittelten Morgenwerten und Abendwerten von $33,5 \pm 15,2$ bzw. $32,0 \pm 16,4$ uU/ml bestand kein signifikanter Unterschied. Die fetten Kühe lagen im Mittel mit $36,0 \pm 25,8$ uU/ml etwas höher als die mageren Kühe mit $30,0 \pm 14,3$ uU/ml. Bei den fetten Kühen lag der Mittelwert der trockenstehenden Tiere (n=3) mit 42,0 uU/ml zwar deutlich über dem der fetten milchgebenden Kühe (n=2) von 25,3 uU/ml. Bei der geringen Gruppengröße war dieser Unterschied jedoch nicht statistisch prüfbar. Signifikante Korrelationen zur Milchleistung und zum Körpergewicht bestanden nicht.

Tabelle 6: Basaler Plasma-Insulin-Spiegel

Kuh Nr.	Milch kg/d	Kondition	Insulin		$\bar{X} \pm SD$
			morgens	abends	
			uU/ml		
764	0	fett	19,4*	24,7*	fett,trockenst.: 42,0
210	0	fett	54,5	42,1	fett,lakt.: 26,9
775	0	fett	64,3	47,0	fett,gesamt: $36,0 \pm 25,8$
696	8,0	fett	19,5	20,3	
674	8,0	fett	$31,1 \pm 4,95^{**}$	$36,6 \pm 6,55^{**}$	
746	8,0	normal	$35,5 \pm 8,03^{**}$	$74,8 \pm 3,45^{**}$	
842	8,0	normal	35,9	16,9	
836	14,5	normal	27,9	11,3	normal,gesamt: $30,0 \pm 14,3$
857	15,5	normal	20,2	26,2	
846	18,0	normal	26,5	24,7	
$\bar{X} \pm SD$			$33,5 \pm 15,2$	$32,0 \pm 16,4$	gesamt: $32,7 \pm 23,2$

* Einzelbestimmungen

** Durchschnitt von 4 Einzelmessungen $\pm SD$

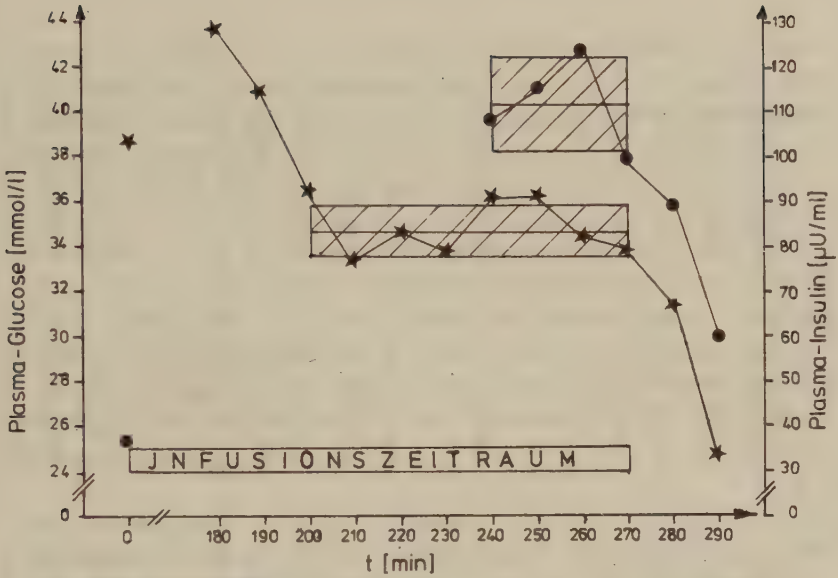
3.3 Glucose-Clamp-Test

3.3.1 Plateau-Werte für Glucose und Insulin

In Abb.6 ist der Verlauf der Glucose- und Insulin-Konzentrationen beim Glucose-Clamp-Test (GCT) an 2 Kühen beispielhaft dargestellt. Bei Kuh Nr. 674 und einigen anderen Kühen stellten sich Glucose-Plateau-Verhältnisse erst nach 200 min Infusionsdauer ein. Bei den meisten Tieren waren Glucose-steady state-Verhältnisse bereits nach 180 min erreicht. Bei Kuh Nr. 674 wurden zudem der Glucose- und Insulin-Spiegel noch 20 min nach Infusionsende verfolgt. Ein deutliches Absinken von Glucose und Insulin durch die Beendigung der exogenen Glucose- und Insulin-Zufuhr war zu erwarten. Die Plateau-Werte für Glucose und Insulin der einzelnen Kühe zu den unterschiedlichen Tageszeiten sind in Tabelle 7 wiedergegeben. Zur Kennzeichnung der Streuung der Einzelwerte innerhalb des Plateauwerts wurde auch die Standardabweichung angegeben. Der Variationskoeffizient der Glucose-Plateau-Werte lag nur in einem Fall über 5% und betrug im Mittel 3,4%. Die Streuung der Insulin-Plateau-Werte war größer. Der Variationskoeffizient betrug hierbei im Mittel 8,4%.

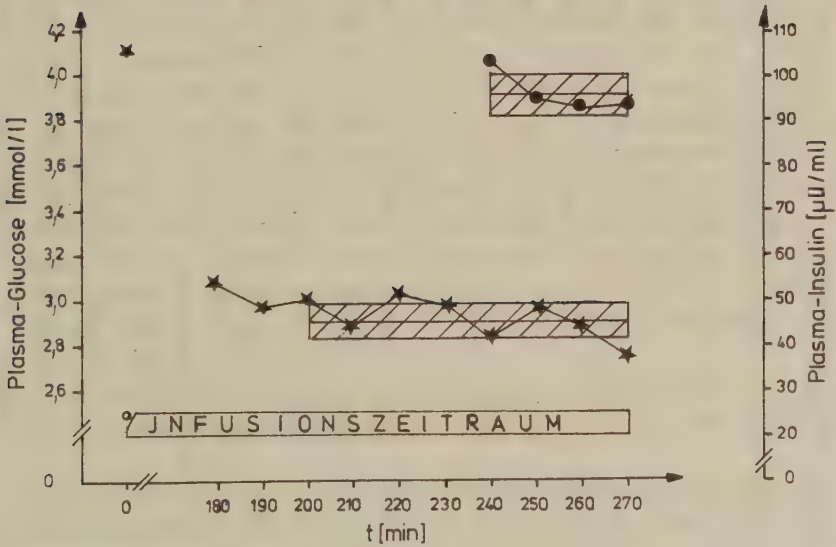
An den Kühen 674 und 746 wurden morgens 2 Glucose-Clamp-Tests durchgeführt. In guter Übereinstimmung befanden sich die Insulin-Plateau-Werte bei den beiden Tests an den einzelnen Tieren. Die Glucose-Plateau-Werte lagen bei Kuh Nr. 674 eng beieinander, bei Kuh Nr. 746 lag das Glucose-Plateau beim zweiten Test 15 % über dem des ersten.

Das Mittel aller Glucose-Plateau-Werte betrug $3,36 \pm 0,58$ mmol/l und lag damit in einem Bereich, den andere Untersucher bei Holstein-Friesian-Hochleistungskühen als physiologischen Plasma-Glucose-Spiegel angaben. Die fetten milchgebenden Kühe lagen morgens mit 3,54 mmol/l Glucose und abends mit 3,07 mmol/l knapp unter den fetten trockenstehenden Tieren mit morgens 3,77 mmol/l und abends 3,35 mmol/l. Das Mittel der fetten Kühe lag morgens bei $3,68 \pm 0,47$ mmol/l, abends bei $3,24 \pm 0,67$ mmol/l. Die normalen Kühe wiesen tiefere Mittelwerte von morgens $3,38 \pm 0,54$ und abends $3,14 \pm 0,69$ mmol/l auf. Morgens lag der



Kuh 674, abends

Das Glucose-Plateau stellte sich in diesem Fall erst nach 200 min ein.
Nach Infusionsende fiel das Glucose- und Insulin-Plateau ab.



Kuh 764, abends

Abb. 6: Glucose-Clamp-Test:

Glucose: ★, Insulin: ●, Plateaubereich mit Mittelwert $\pm$ SD:

Tabelle 7: Glucose-Clamp-Test: Plasma-Plateau-Konzentrationen von Glucose und Insulin

Kuh Nr.	Milch	Kondition	morgens			abends		
			kg/d	mmol/l Glucose	uU/ml Insulin	$\bar{x} \pm SD$	mmol/l Glucose	uU/ml Insulin
764	0	fett		$3,98 \pm 0,17$	$94,8 \pm 1,8$		$2,91 \pm 0,09$	$95,8 \pm 4,7$
210	0	fett		$4,19 \pm 0,16$	$255,4 \pm 6,7$		$4,30 \pm 0,12$	$200,2 \pm 20,8$
775	0	fett		$3,13 \pm 0,09$	$233,2 \pm 14,1$		$2,86 \pm 0,15$	$164,6 \pm 14,8$
696	8,0	fett		$3,22 \pm 0,04$	$104,6 \pm 7,6$		$2,66 \pm 0,15$	$106,4 \pm 24,9$
674**	8,0	fett		$3,90 \pm 0,12$	$189,5 \pm 7,0$		$3,47 \pm 0,12$	$111,5 \pm 10,6$
746**	8,0	normal		$3,80 \pm 0,16$	$199,6 \pm 12,8$			
				$3,97 \pm 0,09$	$179,5 \pm 9,2$		$3,98 \pm 0,08$	$221,3 \pm 25,4$
842	8,0	normal		$4,59 \pm 0,16$	$172,4 \pm 23,9$			
				$3,33 \pm 0,11$	$106,3 \pm 12,6$		$3,24 \pm 0,08$	$115,0 \pm 6,3$
836	14,5	normal		$2,95 \pm 0,08$	$83,1 \pm 5,5$		$2,07 \pm 0,14$	$86,2 \pm 2,9$
857	15,5	normal		$3,24 \pm 0,08$	$110,4 \pm 13,0$		$3,29 \pm 0,14$	$98,8 \pm 3,9$
846	18,0	normal		$3,08 \pm 0,09$	$141,2 \pm 15,4$		$3,12 \pm 0,09$	$123,9 \pm 22,5$
$\bar{x} \pm SD$: fett,trockenst.				3,77	194,5		3,35	153,5
fett,lakt.				3,54	149,6		3,07	109,0
fett, gesamt				$3,68 \pm 0,47$	$176,4 \pm 73,6$		$3,24 \pm 0,67$	$135,7 \pm 44,7$
normal,gesamt				$3,38 \pm 0,54$	$123,4 \pm 36,0$		$3,14 \pm 0,69$	$129,0 \pm 53,7$
gesamt				$3,54 \pm 0,47^*$	$149,9 \pm 56,0$		$3,19 \pm 0,63$	$132,4 \pm 46,8$

* $p < 0,05$ ($n=10$) signifikant gegenüber dem Abendwert

** bei diesen Kühen wurde morgens zweimal ein Glucose-Clamp-Test durchgeführt

Mittelwert aller Kühe bei $3,54 \pm 0,47$ mmol/l und damit signifikant ($p < 0,05$) höher als der Abend-Mittelwert von $3,19 \pm 0,63$ mmol/l. Vor allem die Kühe 764, 696 und 836 hatten abends deutlich erniedrigte Glucose-Plateau-Werte. Nr. 764 und 696 hatten vor Testbeginn auch deutlich erniedrigte Plasma-Glucose-Spiegel.

Demzufolge war in der hier vorliegenden Untersuchung die Insulinresistenz bei Kühen morgens größer als abends ($p < 0,05$). In der Tendenz hatten fette Kühe und insbesondere fette trockenstehende Kühe eine größere Insulinresistenz als die normale laktierende Gruppe. Aufgrund der kleinen Gruppengröße ließen sich hierbei jedoch keine klaren statistischen Aussagen machen. Die Mittelwerte sind in Tabelle 7 zusammengefaßt.

Das Mittel aller Insulin-Plateau-Werte lag bei $137,2 \pm 60,4$ uU/ml. Morgens betrug es $149,9 \pm 56,0$ uU/ml gegenüber $132,4 \pm 46,8$ uU/ml am Abend (n.s.). Große Unterschiede zwischen morgens und abends wiesen nur die Tiere 674, 775 und 210 auf, bei denen das Plateau abends jeweils niedriger war. Fette Kühe hatten morgens mit $176,4 \pm 73,6$ uU/ml ein höheres Plateau als die normale Gruppe mit $123,4 \pm 36,0$ (n.s.). Abends lagen beide Gruppen eng beisammen mit $135,7 \pm 44,7$ uU/ml für fette Tiere und $129,0 \pm 53,7$ für die normale Gruppe. Morgens wie abends lag der Mittelwert der fetten trockenstehenden Tiere jeweils um ca. 45 uU/ml über dem, der fetten laktierenden Kühe. Die Mittelwerte sind in Tabelle 7 dargestellt. Eine große Streuung der Insulin-Plateau-Werte insgesamt, aber auch innerhalb von Tiergruppen, fiel auf. Eigentlich war bei langdauernder Insulin-Infusion mit festgesetzter, auf das metabolische Körpergewicht bezogener Dosis ein in der Höhe ähnliches Insulin-Plateau für alle Kühe erwartet worden.

3.3.2 Metabolische Clearance-Rate von Insulin, Korrelationen beim Glucose-Clamp-Test

Als Ursache für die große Streuung der Insulin-Plateau-Werte wurde eine unterschiedliche Metabolische Clearance-Rate für Insulin bei den einzelnen Kühen vermutet. Sie wurde deshalb für das im GCT zugeführte exogene Insulin bestimmt und auf das Körpergewicht bezogen für die einzelnen Kühe in Tabelle 8 wiedergegeben. Übereinstimmende Clearance-Raten ergaben sich für die 2 Kühe, an denen zwei GCT's derselben

Tabelle 8: Metabolische Clearance-Raten für Insulin sowie die auf das Körpergewicht bezogene Insulin-Clearance

Kuh Nr.	Milch	Kondition	morgens		abends	
	kg/d		$l \cdot min^{-1}$	$ml \cdot min^{-1} \cdot kgKG^{-1}$	$l \cdot min^{-1}$	$ml \cdot min^{-1} \cdot kgKG^{-1}$
764	0	fett	5,5	8,1	5,9	8,6
210	0	fett	2,3	3,3	3,0	4,2
775	0	fett	3,2	3,8	4,6	5,5
696	8,0	fett	5,5	7,9	5,4	7,7
674*	8,0	fett	3,1	4,1	6,7	8,8
			3,0	3,9		
746*	8,0	normal	2,9	4,8	2,8	4,7
			3,0	5,1		
842	8,0	normal	5,8	9,9	4,1	7,1
836	14,5	normal	7,5	12,6	5,5	9,3
857	15,5	normal	4,1	7,9	5,1	9,8
846	18,0	normal	3,5	6,1	4,1	7,1
$\bar{X} \pm SD:$ fett, trockenst.			5,1		6,1	
fett, laktierend			6,0		8,3	
fett, gesamt			$5,4 \pm 2,5$		$7,0 \pm 2,0$	
normal, gesamt			$8,3 \pm 3,1$		$7,6 \pm 2,0$	
gesamt			$6,1 \pm 3,2$		$7,3 \pm 1,9$	

* Bei diesen Kühen zwei Bestimmungen am Morgen

Tageszeit durchgeführt wurden. Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen und die unterschiedliche Tageszeit sind in Tabelle 8 zusammengefaßt. Hierbei ergaben sich keine signifikanten Beziehungen zwischen den Gruppenmittelwerten. Das Mittel aller Werte der Metabolischen Clearance-Rate betrug $6,83 \pm 2,37 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$. In der Tendenz lag die Clearance-Rate am Morgen tiefer als am Abend. Die fetten Kühe hatten zu beiden Meßzeiten eine niedrigere Clearance-Rate als die normale Kontrollgruppe. Die auf das Körpergewicht bezogene Metabolische Clearance-Rate wurde mit dem Basalspiegel von Insulin korreliert. Tabelle 9 gibt Auskunft über die gefundenen Korrelationen.

Tabelle 9: Korrelation zwischen metabolischer Clearance-Rate und basalem Plasma-Insulin

	r	p	Regressionsgleichung*
morgens	-0,568	p 0,1	y = 13,74 - 0,045 x
abends	-0,701	p 0,05	y = 12,40 - 0,039 x
gesamt	-0,597	p 0,01	y = 12,98 - 0,042 x

* x: Insulin-Plateau, y: Clearance-Rate

Korrelationen zwischen Insulin-Plateau und den Parametern: Milchleistung, Körpergewicht, metabolisches Körpergewicht, Plasma-Spiegel von Glucose bzw. Insulin und Glucose-Plateau wurden berechnet. Die positive Korrelation zwischen Glucose-Plateau und Insulin-Plateau war nur abends signifikant mit $r=0,748$ ($p<0,05$). Deutlich positive Korrelationen bestanden zwischen Insulin-Plateau und Insulin-Basal-Spiegel morgens ($r=0,838$, $p<0,01$), abends ($r=0,695$, $p<0,05$) und für alle Werte ($r=0,772$, $p<0,001$). Abb. 7 verdeutlicht diesen Zusammenhang. Die negative Korrelation zwischen Metabolischer Clearance-Rate und basalem Plasma-Insulin-Spiegel sowie die positive Korrelation zwischen Insulin-Plateau und Plasma-Insulin-Spiegel ließen eine unterschiedliche Clearance als Ursache für die Streuung der Insulin-Plateau-Werte als plausibel erscheinen.

Keine signifikanten Korrelationen wurden gefunden zwischen dem Glucose-Plateau bzw. dem Insulin-Plateau und der Milchleistung, Körpergewicht, metabolischem Körpergewicht und basalem Plasma-Spiegel von Glucose bzw. Insulin. Die gefundenen Zusammenhänge sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 zusammengestellt.

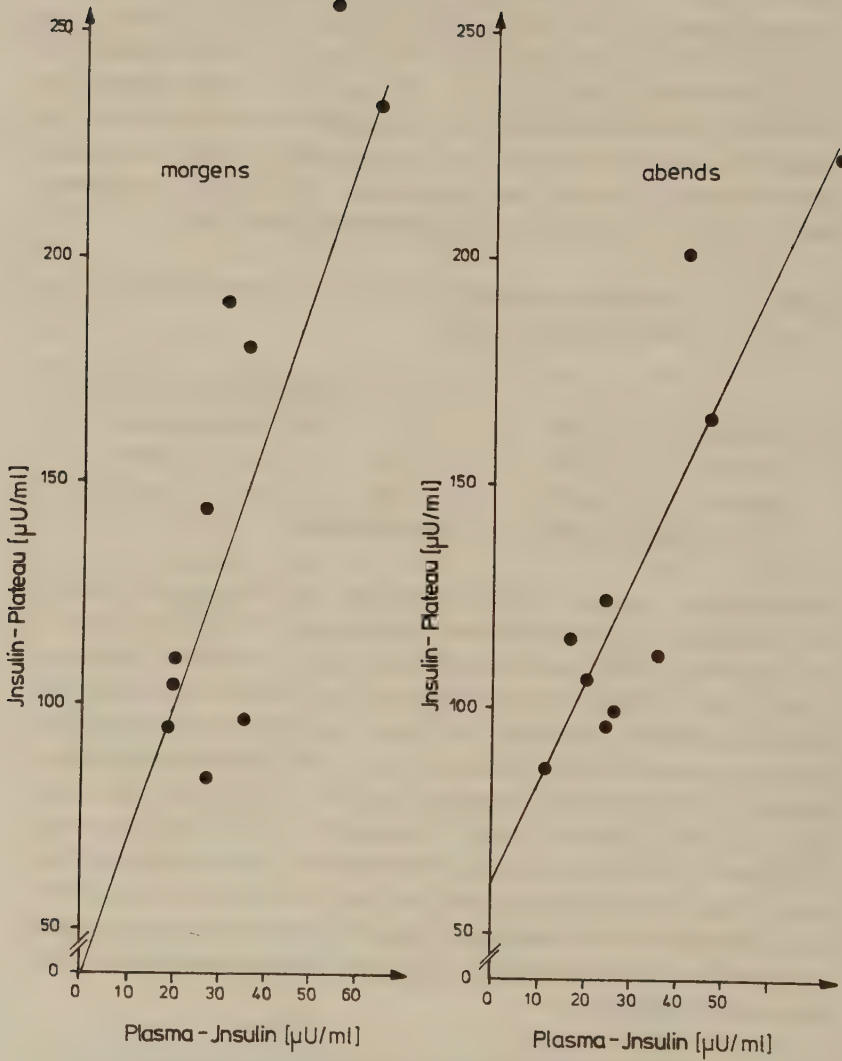


Abb. 7: Korrelation zwischen basalem Insulin-Spiegel und dem Insulin-Plateau bei allen Kühen, morgens und abends

Tabelle 10: Korrelation der Insulin-Plateau-Werte mit anderen Parametern

	r morgens	r abends	r gesamt
Milchleistung	-0,504	-0,413	-0,448*
Körpergewicht	0,601	0,216	0,431
Körpergewicht ^{0,75}	0,598	0,217	0,429
Plasma-Glucose	-0,046	0,309	0,198
Plasma-Insulin	0,838**	0,695*	0,772***
Glucose-Plateau-Wert	0,447	0,750*	0,600**

* p < 0,05
 ** p < 0,01
 *** p < 0,001

Tabelle 11: Korrelation der Glucose-Plateau-Werte mit anderen Parametern

	r morgens	r abends	r gesamt
Milchleistung	-0,471	-0,296	-0,354
Körpergewicht	0,219	-0,011	0,148
Körpergewicht ^{0,75}	0,228	-0,010	0,152
Plasma-Glucose	-0,096	0,286	0,308
Plasma-Insulin	0,149	0,673*	0,458*

* p < 0,05

3.4 Intravenöser Glucose-Toleranz-Test

In Abb. 8 ist in semilogarithmischer Auftragung der Verlauf der Konzentration von Glucose nach Glucose-Belastung bei Kuh Nr. 846 dargestellt, um den monoexponentiellen Abfall der Glucose von 10-40 min nach der Injektion zu verdeutlichen. Die aus dieser Beziehung bei allen Kühen berechneten Halbwertszeiten (HWZ) wurden mit dem Korrelationskoeffizienten zur Zeit als Streuungsmaß in Tabelle 12 wiedergegeben. Bei den Kühen 674 und 746 wurden morgens und abends je 2 intravenöse Glucose-Toleranz-Tests (ivGTT) durchgeführt. Es ergaben sich relativ große Unterschiede zwischen beiden Messungen zur gleichen Tageszeit am gleichen Tier, ohne daß eine Ursache für diese Diskrepanz ersichtlich war. Insbesondere fielen keine Veränderungen der Versuchsbedingungen auf, die zu solch einem Unterschied hätten führen können.

Die Mittelwerte für die Tiergruppen und die unterschiedliche Tageszeit wurden in Tabelle 12 aufgeführt. Die HWZ aller Messungen betrug im Mittel $33,9 \pm 6,7$ min. Morgens lag sie mit $37,3 \pm 6,9$ min höher als abends mit $30,6 \pm 4,4$ ($p < 0,02$). Die Halbwertszeit der fetten Kühe lag morgens bzw. abends im Mittel bei $33,7 \pm 6,3$ bzw. $29,7 \pm 4,7$ min, und damit tiefer als die HWZ der normalen Kühe mit morgens $40,9 \pm 6,3$ und abends $31,5 \pm 4,7$ min. Die fetten trockenstehenden Kühe hatten morgens wie abends eine um 4 min niedrigere HWZ als die fetten Kühe mit 8 kg Milchleistung.

Bei den vorliegend untersuchten Kühen war also die Glucose-Toleranz morgens schlechter als abends ($p < 0,02$). In der Tendenz war sie verbessert bei fetten Tieren und bei trockenstehenden Tieren.

Nicht signifikant korreliert war die HWZ mit folgenden Parametern: Milchleistung, Körpergewicht, Plasma-Spiegel von Insulin und Glucose, Insulin-Plateau-Wert. Die bestehende positive Korrelation zwischen Glucose-Plateau und HWZ war nur abends ($p < 0,05$) und für alle Meßwerte ($p < 0,05$) signifikant und ist in Tabelle 13 wiedergegeben.

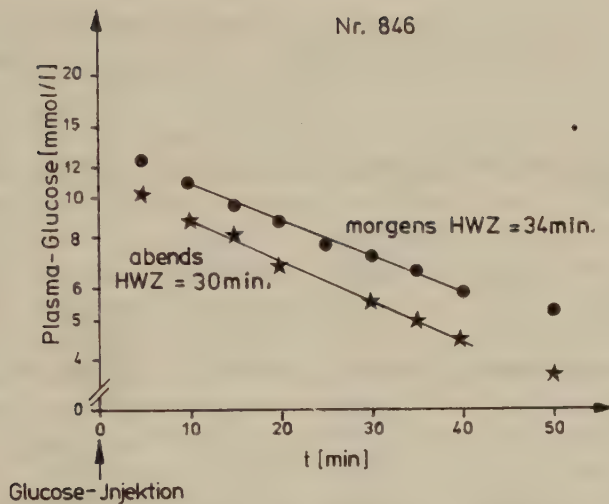


Abb. 8: Intravenöser Glucose-Toleranz-Test in semilogarithmischer Auftragung, Kuh 846, morgens und abends

Tabelle 12: Halbwertzeiten (HWZ) im intravenösen Glucose-Toleranz-Test bei den einzelnen Kühen

Kuh Nr.	morgens				abends	
	Milch kg/d	Kondition	HWZ min	r**	HWZ min	r**
764	0	fett	33,3	-0,996	27,4	-0,996
210	0	fett	38,9	-0,983	34,4	-0,993
775	0	fett	25,0	-0,996	24,9	-0,989
696	8,0	fett	30,8	-0,996	26,5	-0,989
674***	8,0	fett	39,6	-0,993	31,5	-0,989
			41,3	-0,969	38,7	-0,993
746***	8,0	normal	42,3	-0,997	34,5	-0,996
			55,9	-0,989	41,5	-0,983
842	8,0	normal	43,6	-0,998	34,3	-0,994
836	14,5	normal	42,4	-0,994	29,5	-0,998
857	15,5	normal	35,1	-0,995	25,6	-0,997
846	18,0	normal	34,4	-0,994	30,1	-0,997
$\bar{X} \pm SD:$	fett, trockenst.		32,4		28,9	
	fett, laktierend		35,6		30,8	
	fett, gesamt		$33,7 \pm 6,3$		$29,7 \pm 4,7$	
	normal, gesamt		$40,9 \pm 6,3$		$31,5 \pm 4,7$	
	gesamt		$37,3 \pm 6,9^*$		$30,6 \pm 4,4$	

* $p < 0,02$, signifikant gegenüber Abend-Werten

** Korrelationskoeffizienten zur Zeit als Streuungsmaß

*** Morgens und abends wurden 2 Glucose-Toleranz-Tests durchgeführt

Tabelle 13: Korrelation zwischen Halbwertszeit des ivGTT und Glucose-Plateau des GCT

	morgens	abends	gesamt
r	0,441	0,654*	0,559*

* $p < 0,05$

3.4.1 Insulinantwort auf den intravenösen Glucose-Toleranz-Test

Bei allen Kühen wurde morgens bei einem ivGTT die Insulinantwort gemessen. Die Daten sind in Abb. 9a und 9b graphisch dargestellt. Große individuelle Unterschiede im Verlauf der Antwortkurven bestanden für die einzelnen Tiere. Gemeinsam war allen Tieren ein Maximal-Wert bei 15-20 min und ein anschließend gleichmäßiges Absinken des Insulin-Spiegels mit weitgehender Normalisierung nach 60 - 70 min. Große Unterschiede bestanden in der Höhe der maximalen Antwort und der Insulinantwort-Fläche. 2 Kühe zeigten zweigipfelige Verlaufskurven, die anderen, ein eingipfliges Verlaufsmuster. Zur Charakterisierung der Kurven wurden die Insulinantwort-Fläche über dem basalen Plasma-Spiegel, die Abfallsneigung von 20-60 min, das Produkt aus HWZ und Insulinantwort-Fläche sowie Regressions- und Korrelationskoeffizient zwischen Insulinantwort-Kurve und zugehörigem Glucose-Abfall berechnet und in Tabelle 14 aufgeführt. Mittelwerte für die einzelnen Tiergruppen sind ebenfalls aus Tabelle 14 ersichtlich. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der einzelnen Parameter. Trotzdem hatten die fetten Tiere im Mittel eine deutlich größere Insulinantwort-Fläche als die normale Gruppe. Auch die Neigung des Insulin-Abfalls und insbesondere das Produkt aus HWZ und Insulinantwort-Fläche waren bei der fetten Gruppe größer.

Die Insulinantwort-Fläche war weder zum basalen Plasma-Insulin-Spiegel, noch dem Insulin-Plateau sowie dem Glucose-Plateau des GCT signifikant korreliert. Für alle Tiere ergab sich eine gute Korrelation zwischen Plasma-Spiegeln von Insulin und Glucose während des ivGTT's mit allerdings unterschiedlichen Regressionskoeffizienten b. Keine signifikant positive Korrelation bestand zwischen dem Produkt HWZ x Insulinfläche und dem Glucose-Plateau des GCT, wie sie vermutet werden könnte, unter der Annahme, daß eine geringe Insulinantwort bei großer Glucose-Toleranz, also kleiner HWZ, gleichbedeutend sei mit guter Ansprechbarkeit auf Insulin, also geringer Insulinresistenz.

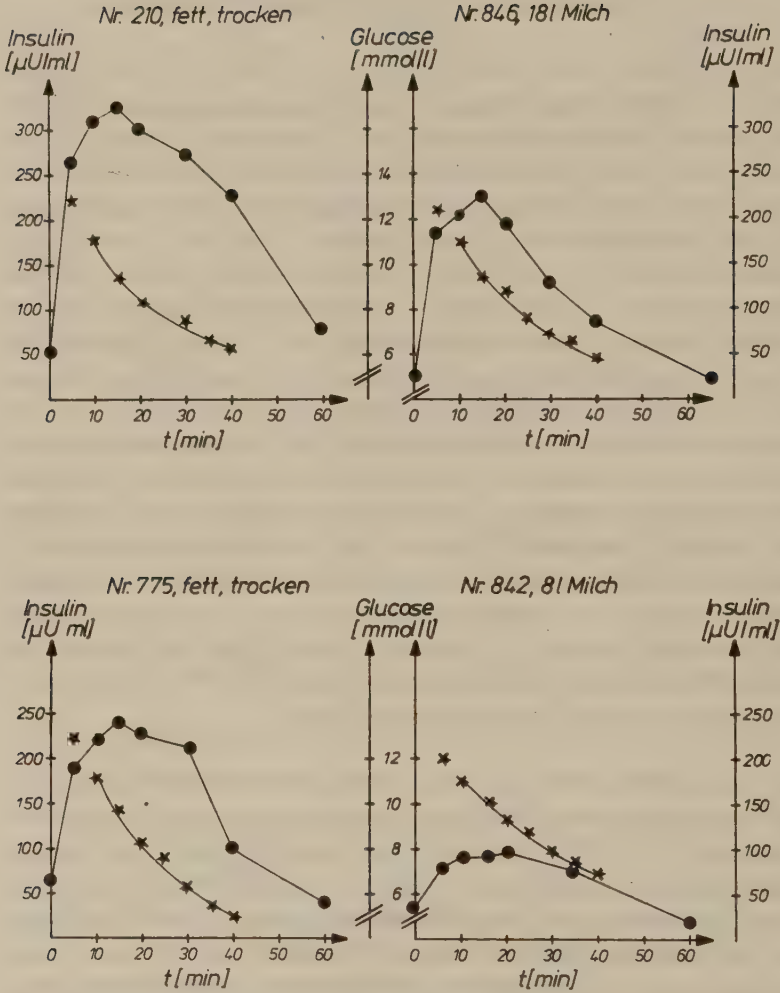


Abb. 9a: Intravenöser Glucose-Toleranz-Test,
Kühe 210, 846, 775, 842, morgens.
Jeweils die bei zwei Kühen am gleichen Tag durchgeführten
Tests sind gegenübergestellt.
Glucose: ★ , Insulin: ●

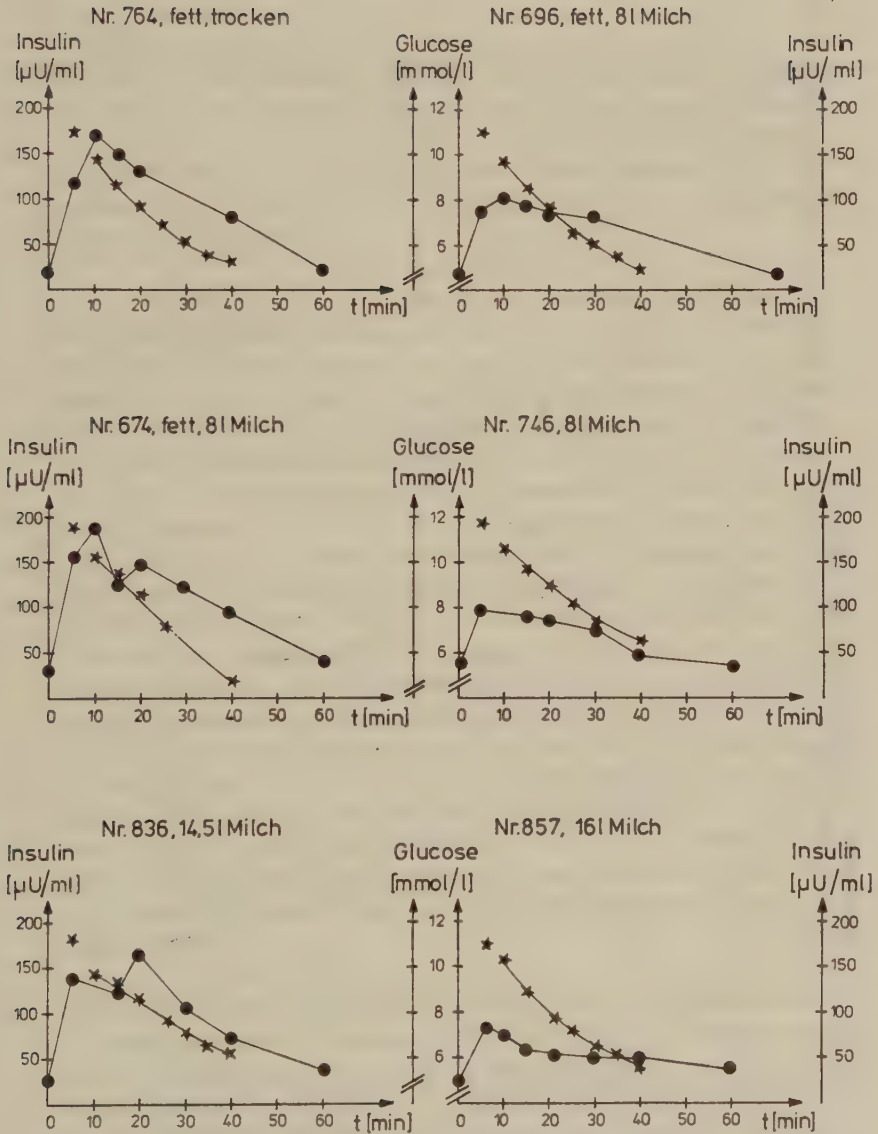


Abb. 9b: Intravenöser Glucose-Toleranz-Test
Kühe 764, 696, 674, 746, 836, 857, morgens.
Glucose: ★ , Insulin: ●

Tabelle 14: Intravenöser Glucose-Toleranz-Test, morgens:
Insulinantwort-Fläche, Neigung des Insulin-Abfalls, Korrelation und Regression zwischen Glucose
und Insulin, Produkt aus HWZ und Insulinantwort-Fläche

Kuh Nr.	Milch kg/d	Kondition	Fläche min. uU·ml ⁻¹	Neigung	r	b	Fläche HWZ min ² uU·ml ⁻¹
764	0	fett	4,6	-2,7	0,991	25,6	353
210	0	fett	10,4	-5,7	0,887	34,2	405
775	0	fett	5,4	-5,3	0,844	23,9	135
696	8,0	fett	3,0	-1,4	0,940	13,0	92
674	8,0	fett	4,8	-2,6	0,926	21,7	198
746	8,0	normal	1,8	-1,3	0,963	13,0	76
842	8,0	normal	2,5	-1,2	0,868	7,5	107
836	14,5	normal	4,2	-3,0	0,897	24,2	178
857	15,5	normal	1,9	-0,5	0,950	5,8	67
846	18,0	normal	5,8	-3,7	0,949	30,5	199
$\bar{X} \pm SD$:	fett		5,6 $\pm$ 2,8	-3,5 $\pm$ 1,8	0,917 $\pm$ 0,06	23,7 $\pm$ 7,6	237 $\pm$ 136
	normal		3,2 $\pm$ 1,7	-1,9 $\pm$ 1,3	0,905 $\pm$ 0,04	16,2 $\pm$ 10,6	125 $\pm$ 60
	gesamt		4,4 $\pm$ 2,5	-2,7 $\pm$ 1,8	0,911 $\pm$ 0,05	19,9 $\pm$ 9,6	181 $\pm$ 115

3.5 Inulinraum

Der Inulin-Verteilungsraum wurde bestimmt, um über das Extrazellulär-volumen der Tiere ein quantifizierbares Maß für den Körper-Fettgehalt zu erlangen. Dies wiederum sollte Anhaltspunkte für einen besseren Dosierungsmodus für den GCT und den ivGTT liefern. Zum andern wäre ein Einfluß des Körperfetts auf die Ergebnisse beim GCT und ivGTT dadurch besser charakterisierbar.

Die berechneten und auf das Körpergewicht bezogenen Werte für den Inulin-Verteilungsraum wurden in Tabelle 15 wiedergegeben. Bei den Kühen 674 und 746 ließ sich beim Versuch am Morgen keine sinnvolle Meßreihe des Inulin-Verlaufs bestimmen. Bei den Kühen 857, 836, 846, und 696 bestand eine große Differenz zwischen Morgen- und Abendmessung. Zur näheren Charakterisierung des Inulin-Verteilungsraums wurde deshalb mit Hilfe eines pharmakokinetischen 3-Kompartiment-Computer-Programms bei einigen Kühen der Inulin-Verteilungsraum bestimmt. Die Addition der zwei extrazellulären Kompartimente ergab Größen des Verteilungsraumes, die in 6 von 8 Bestimmungen etwas größer als die mit der Abschälmethode gefundenen Werte waren. Dennoch konnte keine allgemeine Beziehung zwischen dem 2-Kompartiment-Verteilungsraum und dem durch Abschälen der Kurven berechneten Verteilungsraum gefunden werden. Auch der mit dem Computer berechnete Verteilungsraum zeigte bei den Kühen 836 und 842 eine große Varianz zwischen Morgen- und Abendwert. Es mußte deshalb angenommen werden, daß nicht Fehler in der mathematischen Berechnung, sondern eher endogene Faktoren der Kuh während des Tests, wie unterschiedliche Eliminierung durch die Niere, unterschiedliche Metabolisierung und möglicherweise auch ein Abfluß in den Magen-Darm-Trakt oder des Euter, für die große Streuung zwischen Einzelmessungen bei einigen Kühen verantwortlich war.

Für die Berechnung der Mittelwerte wurden nur die mit der Abschälmethode gewonnenen Meßwerte verwendet, da nicht von allen Messungen ein mittels Computer berechneter Verteilungsraum vorlag. Der Mittelwert aller Messungen betrug $114,6 \pm 18,7$ ml/kgKG. Morgens lag er bei $124,2 \pm 31,3$ ml/kgKG gegenüber abends von $106,8 \pm 20,6$ ml/kgKG. Fette Kühe hatten einen Mittelwert von $100,1 \pm 13,0$ ml/kgKG gegenüber der normalgewichtigen Kontrollgruppe mit $129,0 \pm 12,9$ ml/kgKG. Der Unterschied zwischen fetten und normalen Tieren war signifikant ($p < 0,01$).

Tabelle 15: Inulin-Verteilungsraum

Kuh Nr.	Milch	Kondition	morgens	abends	
	kg/d		ml/kgKG	ml/kgKG	$\bar{X} \pm SD$
764	0	fett	94	95	
210	0	fett	92 (110)*	85 (113)*	
775	0	fett	128	122	fett: ** 100,1 $\pm$ 13,0
696	8,0	fett	103	73	
674	8,0	fett	-	109	
746	8,0	normal	-	106	
842	8,0	normal	121 (128)	137 (151)	
836	14,5	normal	140 (164)	119 (104)	normal: 129,0 $\pm$ 12,9
857	15,5	normal	174	130	
846	18,0	normal	142 (141)	92 (142)	
			$\bar{X} \pm SD$	gesamt:	
			124,2 $\pm$ 31,3	106,8 $\pm$ 20,6	114,6 $\pm$ 18,7

* Werte in Klammern sind die mit dem Computerprogramm berechneten Verteilungsräume

** $p < 0,01$, signifikant gegenüber der normalen Tiergruppe

Tabelle 16: Korrelation des Inulin-Verteilungsraumes zu Parametern, von denen eine Korrelation zum Körperfett erwartet wurde

	r	fett	mager	gesamt
Brustumfang		0,560	-0,892	-0,605
Körpergew.		0,956*	-0,832	-0,452
Körpergew. ^{0,75}		0,956*	-0,833	-0,467
Körpergew./Widerristhöhe		0,859	-0,758	-0,503
Brustumf./Widerristhöhe		-0,178	-0,172	-0,668*

* $p < 0,05$

Die Durchschnittswerte für die einzelnen Kühe wurden mit folgenden Parametern korreliert: dem Brustumfang, dem Körpergewicht, dem metabolischen Körpergewicht, dem Quotienten aus Körpergewicht und Widerristhöhe sowie dem Quotienten aus Brustumfang und Widerristhöhe. Die Korrelationskoeffizienten sind in Tabelle 16 wiedergegeben. Für all diese Parameter konnte eine gewisse Korrelation zum Körperfettgehalt angenommen werden. Trotzdem konnten keine signifikanten Korrelationen gefunden werden. Auch zwischen Inulin-Verteilungsraum und der HWZ sowie den Plateau-Werten von Glucose und Insulin bestand keine signifikante Beziehung.

Da allerdings beim GCT mit der auf metabolisches Körpergewicht bezogenen Dosierung physiologische Plasma-Plateau-Werte von Glucose erreicht wurden und sich die Mittelwerte von Glucose-Plateau und HWZ von fetten und normalen Tieren nicht signifikant unterschieden, konnte auf eine genaue Bestimmung des Körperfetts verzichtet werden.

4 Diskussion

Im Folgenden wird zuerst kurz auf den berechneten Verteilungsraum von Inulin eingegangen. Anschließend werden die in der vorliegenden Untersuchung gefundenen basalen Plasma-Spiegel von Glucose und Insulin mit Angaben aus der Literatur verglichen. Dann soll der in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Glucose-Clamp-Test mit anderen Tests zur Bestimmung der Insulinresistenz verglichen werden. Insbesondere soll dabei auf das Prinzip des Tests und seine Anwendbarkeit bei Wiederkäuern eingegangen werden. Genauer sollen auch die unterschiedlichen Insulin-Plateau-Konzentrationen beim Glucose-Clamp-Test erörtert werden. Schließlich sollen die Meßergebnisse beim Glucose-Clamp-Test erläutert und ein Zusammenhang zu den anderen gemessenen Parametern des Zucker-Stoffwechsels hergestellt werden.

Die Inulinraum-Bestimmungen der Kühe sollten zur Erstellung eines objektivierbaren Parameters des unterschiedlichen Fettansatzes der Tiere dienen. Unter der Annahme, daß Körperfett ein Gewebe mit geringem Anteil an Extrazellulärflüssigkeit ist, sollten fette Tiere einen auf das Körpergewicht bezogenen geringeren Inulinraum aufweisen als Tiere mit normalem Fettansatz. Es konnten keine Angaben über bereits durchgeführte Inulinraum-Bestimmungen an Wiederkäuern in der Literatur gefunden werden.

Andere Methoden zur Bestimmung des Körperfetts, wie die Bestimmung des Körperwassers mit der Deuterium-Verdünnungsmethode (Foot et al., 1970, Cowan et al., 1979) der Fettbestimmung am Schlachtkörper (Robelin, 1982) und Bestimmung der Fettzellgröße (Robelin) schieden für die vorliegende Untersuchung aus.

Zwar hatten die fetten Kühe mit im Durchschnitt $100,1 \pm 13,0$ ml/kgKG gegenüber der normalen Gruppe mit $129,0 \pm 12,9$ ml/kgKG wie vermutet einen signifikant niedrigeren Inulin-Verteilungsraum (siehe auch Tabelle 15); jedoch fanden sich häufig große Differenzen zwischen der Morgen- und Abendmessung an den einzelnen Kühen, so daß davon ausgegangen werden mußte, daß neben dem Körperfett andere Faktoren für die Varianz dieses Parameters mitverantwortlich war. Jedenfalls war der

Inulin-Verteilungsraum beim Einzeltier als Maß für den Fettansatz nicht verwertbar. Bei dem fehlenden signifikanten Unterschied der gemittelten Insulinresistenz zwischen fetten und normalgewichtigen Kühen konnte auf eine genaue Bestimmung des Fettansatzes und deren direkte Korrelation zu Parametern des Kohlenhydratstoffwechsels jedoch verzichtet werden.

Zudem deutete das Fehlen signifikanter Korrelationen von Glucose- und Insulin-Plateau beim GCT der vorliegenden Untersuchung zu Körpergewicht, metabolischem Körpergewicht und Inuliraum auf den richtig gewählten Dosierungs-Modus für Glucose und Insulin hin.

Loensman-Poulsen (1977) erhielt mit der in der vorliegenden Untersuchung durchgeführten Inulinraum-Bestimmungsmethode bei 9 erwachsenen Männern Durchschnittswerte von 147 ± 16 ml/kgKG. Dies könnten durchaus vergleichbare Werte gegenüber der normalgewichtigen Tiergruppe darstellen, wenn man bedenkt, daß beim Wiederkäuer der intraruminale und intestinale Gewichtsanteil am Körpergewicht wesentlich größer ist als beim Menschen.

Der in der vorliegenden Untersuchung bestimmte Plasma-Glucose-Spiegel von im Mittel $3,88$ mmol/l entsprach ungefähr dem Wert, den Furtmayr (1975) im Mittel und Veitinger (1983) ante partum bei Holstein-Friesian-Kühen derselben Milchviehherde ermittelten (siehe auch Tabelle 1). 10 - 20 % niedrigere Werte erhielten Athanasiou et al. (1978), Vasilatos et al. (1981), Kronfeld et al. (1982), Jones (1982) und Veitinger (1983) bei Holstein-Friesian-Kühen während der Laktation. Hierbei handelte es sich jedoch um Tiere mit erheblich größerer Milchleistung und zum Großteil um Messungen zu Beginn der Laktation. Vasilatos (1981) fand eine Erhöhung des Plasma-Glucose-Spiegels mit fortschreitender Laktation an 5 Holstein-Friesian-Kühen.

Die vergleichsweise höheren Spiegel der vorliegenden Untersuchung (siehe Tabelle 5) konnten deshalb zum einen dadurch erklärt werden, daß durchweg Kühe im fortgeschrittenen Laktationsstadium untersucht wurden, zum anderen dadurch, daß 3 von 10 Tieren nicht laktierend waren (2 Kühe und 1 Rind) und deren Mittelwert morgens wie abends über dem Durch-

schnitt der übrigen Tiere lag. Auffallend war eine signifikante Erniedrigung des Plasma-Glucose-Spiegels am Abend. Einen in der Tendenz gleichen Unterschied der Plasma-Glucose-Spiegel zwischen Morgen- und Abendmessung fand auch Kosak (1980) an Tieren derselben Herde. Phillips und Athanasiou (1978) fanden nur eine geringe tageszeitliche Schwankung des Plasma-Glucose-Spiegels bei Rindern. Erniedrigt jedoch waren dort die Spiegel kurzzeitig während der Meßperioden im Anschluß an das Melken. Die Abendmessungen in der vorliegenden Untersuchung wurden zwar direkt im Anschluß an das Melken vorgenommen, während zwischen Melkzeit und Morgenmessung ein Zeitraum von ca. 3 h lag. Jedoch lagen auch bei den nicht laktierenden Kühen die Glucose-Spiegel gleichermaßen abends um ca. 10 % niedriger als morgens.

Ein Teil der tageszeitlichen Differenz ist möglicherweise über den Einfluß einer vorangegangenen Glucose-Belastung auf den Glucose-Spiegel sowie ein kurzzeitiges Absinken desselben nach dem Melken erklärbar. Einflüsse anderer Art, insbesondere streß- und fütterungsbedingte, können nicht sicher ausgeschlossen werden. Eine verminderte Insulinresistenz am Abend als Ursache für den erniedrigten Plasma-Glucose-Spiegel wird an geeigneter Stelle erläutert.

Angaben über Plasma-Insulin-Spiegel weisen große Unterschiede auf, sowohl bei verschiedenen Untersuchern, als auch bei unterschiedlichen Tiergruppen einzelner Untersucher, auf (z.B. Hart et al., 1980: 15,3-162,3 uU/ml bei Tiergruppen mit unterschiedlicher Milchleistung).

Der mittlere Plasma-Insulin-Spiegel der vorliegenden Untersuchung von $32,7 \pm 23,2$ uU/ml lag geringgradig höher als der, den Walsh (1980) und Veitinger (1983) bei Holstein-Friesian-Kühen fanden. Vasilatos (1981) fand bei 5 Holstein-Friesian-Kühen 30 Tage post partum mittlere Spiegel von 17 uU/ml, 90 Tage post partum jedoch Spiegel von 29,3 uU/ml. Das fortgeschrittene Laktationsstadium könnte für die, bei der vorliegenden Untersuchung gefundenen hohen Werte, verantwortlich sein. Für eine, bei den vorliegenden Ergebnissen, wie auch denen anderer Untersucher auftretende, relativ große Streuung zwischen den Tieren und

beim Einzeltier könnte hier durch die, während der Untersuchung unbeeinflusste Futteraufnahme erklärt sein, weil die Futteraufnahme schon innerhalb weniger Minuten eine deutliche Insulin-Zunahme im Blut bewirkt (Chase, 1977).

Morgens wie abends lag der Mittelwert trockenstehender Kühe deutlich über dem der milchgebenden Kühe (siehe Tabelle 6). Mehrere Untersucher (Blum et al., 1973, Veitinger, 1983) fanden bei Kühen unterschiedlicher Rassen während des Trockenstehens deutlich höhere Werte als zu Beginn der Laktation. Hart et al. (1979) fanden zwar keine deutlich negative Korrelation zwischen Insulin und Milchleistung, veröffentlichten aber 1980 eine Untersuchung, bei der 4 wenig leistende Hereford-Kreuzungen gegenüber 4 hochleistenden Holstein-Friesian-Kühen zu allen Laktationszeitpunkten einen um ein vielfaches erhöhten Plasma-Insulin-Spiegel hatten. Keine signifikanten Unterschiede fanden sich zwischen Morgen- und Abendwerten in der vorliegenden Untersuchung. Größer, wenn auch nicht signifikant, war der Unterschied zwischen normalen und fetten Tieren. Höhere Insulin-Spiegel der fetten Tiere könnten Ausdruck einer erhöhten Insulinresistenz sein.

Diese Insulinresistenz des Gesamtorganismus sollte mit der Glucose-Clamp-Methode untersucht werden. Um jedoch einen Test unter stallangepassten Verhältnissen durchführen zu können, mußten 2 klassische Methoden zur in vivo Insulinresistenz-Bestimmung kombiniert werden. Der Glucose-Clamp-Test von De Fronzo et al. (1979), mit einer steuerbaren Glucose-Infusion, bei angehobenem Insulin-Spiegel, euglycämische Verhältnisse zu erreichen, war mit hohem technischen Aufwand verbunden, weil schon während des Tests in kurzzeitigem Abstand der Plasma-Glucose-Verlauf bestimmt werden mußte und eine Umrechnungsformel dann sofort die Neueinstellung der Glucose-Infusion erlaubte. Der Insulin-Suppressions-Test von Olefski et al. (1974) war technisch zwar wenig aufwendig, erforderte aber die Anwendung von Adrenalin und Propanolol und kam deshalb in dieser Form bei hochleistenden Milchkühen nicht in Frage. In der vorliegenden Untersuchung sollte deshalb mit einer konstant laufenden Dauerinfusion aus Glucose und Insulin, bei erhöhtem Plasma-Insulin-Plateau, ein euglycämischer Plasma-Glucose-Spiegel erreicht werden.

Der entscheidende Vorteil dieses Tests war eine einfache Anwendbarkeit trotz des Verzichts auf eine pharmakologische Insulin-Sekretions-Hemmung. Der Nachteil dieses Tests war jedoch, daß das Glucose-Plateau nur in relativ engen physiologischen Grenzen als sicher quantifizierbares Maß für die Insulinresistenz gelten konnte, weil anzunehmen war, daß bei stark veränderter Insulinresistenz nach oben oder unten ein zur Insulinresistenz proportionales starkes Absinken bzw. Ansteigen des Plasma-Glucose-Plateau-Werts außerhalb euglycämischer Grenzen durch gegenregulierende Hormone verhindert werden würde.

Der hier durchgeführte Glucose-Clamp-Test (GCT) war deshalb auch nicht geeignet zur Aufstellung von Insulin-Dosis-Antwortkurven über einen größeren Bereich, zumindest unter Beibehaltung der Glucose-Dosis, weil hierbei zwangsläufig große Abweichungen der Plasma-Glucose von der physiologischen Norm zu erwarten waren. Die Erstellung von Insulin-Dosis-Antwortkurven wäre dann von Bedeutung, wenn mit Hilfe zusätzlich durchgeführter Insulin-Rezeptor-Studien an Zellen geklärt werden sollte, ob eine veränderte Insulinresistenz durch Änderung der Rezeptorzahl oder -affinität, oder durch post-Rezeptor-Mechanismen zustande kommt.

Bei relativ kleiner Abweichung der Insulinresistenz von der Norm konnte der Glucose-Plateau-Wert jedoch als sensibles Maß für die Insulinresistenz gewertet werden. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden keine großen Differenzen erwartet, und tatsächlich befanden sich die Glucose-Plateau-Werte fast aller Kühe in engen physiologischen Grenzen. Sie betrugen im Mittel $3,36 \pm 0,58$ lagen damit zwar 13 % unter dem gemittelten basalen Plasma-Glucose-Spiegel aller Kühe, entsprachen aber dem Plasma-Glucose-Spiegel, den andere Untersucher als Durchschnittswert angeben. Allein bei Rind 210 abends (4,3 mmol/l) und bei Kuh 746 abends, zweiter Test (4,6 mmol/l) lagen die Plateau-Werte geringgradig oberhalb des physiologischen Bereichs. Ein Absinken des Glucose-Spiegels unter physiologische Werte zeigte sich bei Kuh 836 abends (2,1 mmol/l). Eine genaue Quantifizierung der Insulinresistenz bei diesen Kühen kann natürlich in Frage gestellt werden. Sie wurde in dieser Untersuchung dennoch vorgenommen, weil, wie die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen an Zwergziegen zeigten, durch unterschiedliche, die Insulinresistenz beeinflussende Faktoren, eine um ein vielfaches größere Spanne von Glucose-Plateau-Werten erreicht werden konnte.

Beck et al. (1983) erarbeiteten diesen GCT an Zwergziegen mit anfangs unterschiedlichen Dosierungen von Insulin und Glucose. Die günstigste Dosierung zur Erreichung eines euglycämischen Spiegels von $6,88 \text{ mg Glucose} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^(0,75) und $3,44 \text{ mU Insulin} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ^(0,75) konnte mit vergleichbaren Ergebnissen auf das Rind übertragen werden. Die Messung der Plateau-Werte wurde bei den Ziegen ab der 180. min nach Infusionsbeginn durchgeführt, weil Kloe (1983) bei Dauerinfusionen von Glucose an Zwergziegen eine Zeit von 180 min zur Erreichung eines Glucose-Plateau-Wertes ermittelte. Bei einigen Kühen stellte sich ein solches Plateau erst nach 200 min ein, so daß der Plateau-Zeitraum entsprechend eingegrenzt werden mußte.

In den Untersuchungen von Beck et al. (1983) fand sich trotz veränderter HWZ kein Unterschied für die Insulinresistenz zwischen morgens und abends. 3 Tage Nahrungsentzug hatte annähernd eine 4-fache Erhöhung des Glucose-Plateau-Wertes zur Folge bei gleichzeitiger Verdoppelung der HWZ. Auch Gaben des diabetisch wirksamen Steptozotocin verdoppelte HWZ und Insulinresistenz. Der Glucose-Plateau-Wert gefütterter Ziegen am Morgen lag bei $3,0 \pm 0,3 \text{ mmol/l}$ und damit etwas tiefer als der gemittelte Glucose-Plateau-Wert von Kühen der vorliegenden Untersuchung.

Kürzlich veröffentlichten Weekes et al. (1983) eine Arbeit, in der sie mit Hilfe der euglykämischen Insulin-Clamp-Technik die Insulinresistenz von Schafen, die bei unterschiedlicher Umgebungstemperatur gehalten wurden, bestimmten. Dieser aufwendige Test wurde in enger Anlehnung an De Fronzo's Arbeiten (1979) durchgeführt. Die steuerbare, gemittelte Glucose-Infusions-Rate von 80-120 min nach Beginn der Infusion bei gleichbleibendem festgesetzten euglykämischem Plateau diente dabei als Maß für die Insulinresistenz. Die Glucose-Infusion regelten Weekes et al. empirisch. Zur Plasma-Glucose-Bestimmung während des Tests waren 6-7 min notwendig, so daß die Steuerung mit diesem Zeitintervall dem tatsächlichen Plasma-Glucose-Verlauf hinterherhinkte. Durch den unterschiedlichen Parameter zur Bestimmung der Insulinresistenz bei Weekes et al. (1983) und der vorliegenden Arbeit war diese in beiden Arbeiten nicht direkt vergleichbar.

Weekes et al. (1983) untersuchten die Insulinresistenz bei sehr unterschiedlichen Insulin-Plateau-Werten, die sich bei Insulin-Dosierungen zwischen $0,2$ und $30 \text{ mU} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ einstellten. Die Streuung, mit der sich die Insulin-Plateau-Werte für die unterschiedlichen Dosierungen einstellten, lag für alle Insulin-Dosierung in einer Größenordnung wie bei den vorliegenden Untersuchungen.

Ein möglicher Einfluß auf das Glucose-Plateau durch das sich mit relativ großem Streubereich einstellende Insulin-Plateau (Tabelle 7) mußte natürlich in Betracht gezogen werden. Weekes et. al. stellten in ihren GCT's an Schafen eine Insulin-Dosis-Wirkungskurve im Bereich von $0,2 - 30 \text{ mU} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ Insulin auf. Halbmaximale Stimulation der Glucose-Utilisation fanden sie dabei bei Plasma-Insulin-Konzentrationen von ca. 38 uU/ml für alle Kontrollgruppen. Die Insulin-Plateau-Konzentrationen in der vorliegenden Untersuchung von durchschnittlich $137,2 \pm 60,4 \text{ uU/ml}$ (Tabelle 7) lagen auf dieser Kurve in einem submaximalen Bereich, wo auch ein sehr großer Unterschied im Insulin-Plateau nur einen sehr geringen Unterschied in der Glucose-Utilisation hervorrief, also den Plasma-Glucose-Spiegel nur unwesentlich beeinflusste. Dieser Effekt war also, wenn man die Ergebnisse vom Schaf auf das Rind übertrug, zu vernachlässigen.

Trotzdem waren die unterschiedlichen Insulin-Plateau-Werte von Interesse und verlangten nach einer Klärung, insbesondere da in der vorliegenden Untersuchung der basale Plasma-Insulin-Spiegel und das Insulin-Plateau eng miteinander korreliert waren. Ursache konnte erstens ein unterschiedlicher Verteilungsraum für Insulin bei den einzelnen Tieren sein. Zweitens konnte die endogene Insulin-Sekretionsrate während des Tests unterschiedlich stark beeinflusst sein. Drittens konnten Unterschiede in der Metabolischen Clearance-Rate von Insulin bestehen. Gegen einen unterschiedlichen Verteilungsraum als Ursache der großen Varianz des Insulin-Plateau-Werts sprach, daß keine signifikante Korrelationen des Insulin-Plateau-Werts zu Körpergewicht, metabolischem Körpergewicht und Inulinraum gefunden werden konnten und zudem bei der langen Infusionsdauer das Verteilungsgleichgewicht hergestellt sein sollte. Eine unterschiedliche Sekretionsrate erschien unwahrscheinlich, wenn man

Untersuchungen von De Fronzo (1979) zugrunde legte, bei denen beim GCT die endogene Insulin-Sekretionsrate um ca. 50 % gehemmt wurde. Auch bestand keine enge positive Korrelation zwischen Insulin-Plateau und dem Glucose-Plateau, wie dies zu erwarten wäre, wenn der Glucose-Spiegel als Sekretionsreiz für endogenes Insulin diene. Vielmehr konnte als Ursache eine unterschiedlichen Metabolische Clearance-Rate für Insulin bei den einzelnen Tieren angenommen werden. Sie wurde berechnet und war signifikant negativ zum basalen Plasma-Insulin-Spiegel korreliert. Hart et al. (1980) hingegen fand bei unterschiedlichem Plasma-Insulin-Spiegel bei Kühen in unterschiedlichem Laktationsstadium vor allem die Sekretionsrate des Hormons verändert.

Die Metabolische Clearance-Rate von durchschnittlich $6,8 \pm 2,37$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$ (siehe auch Tabelle 8) lag bei der vorliegenden Untersuchung um eine Zehnerpotenz höher, als sie Hart et al. (1980) aus Berechnungen nach einmaliger Insulin-Injektion mit monoexponentiellem Insulin-Abfall und Extrapolation der Verlaufsgeraden auf die Y-Achse fanden. Diese Diskrepanz dürfte durch die unterschiedliche Bestimmungsmethode bedingt sein. Weekes et al. (1983) erhielten, je nach Höhe der Insulin-Plateau-Werte und auch für die in unterschiedlicher Umgebung gehaltenen Tiergruppen eine unterschiedliche Metabolische Clearance-Rate von $5 - 18$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$. Bei niedrigem Insulin-Plateau und bei Schafen, die in warmer Umgebung gehaltenen wurden, war sie am höchsten. Bei einem Insulin-Plateau von 100 uU/ml lag sie für die warmgehaltenen Schafe bei ca. 11 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$. Trenkle (1971) fand nach einmaliger Insulin-Injektion bei Schafen eine Metabolische Clearance-Rate von $7 - 9$ $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$.

Doberne (1981) wies auf eine zunehmende Verbesserung der Glucose-Verwertung mit zunehmender Dauer von Glucose-Clamp-Studien hin. Gegenüber der 2. Stunde war in der 3. Stunde von GCT's nach De Fronzo die Glucose-Infusions-Rate zur Erhaltung der Euglycämie um $18 - 21$ % gesteigert. Nach 4 - 6 Stunden war keine weitere Steigerung der Glucose-Utilisation mehr zu verzeichnen. Für die vorliegende Untersuchung war deshalb wichtig, daß allen Tieren über den gleichen Zeitraum Glucose und Insulin infundiert wurde.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine signifikante Erniedrigung der Insulinresistenz um 10 % bei Holstein-Friesian-Kühen am Abend gemessen (Tabelle 7). Durch die verminderte Insulinresistenz waren der signifikant erniedrigte Plasma-Glucose-Spiegel (Tabelle 5), die signifikant verbesserte Glucose-Toleranz (Tabelle 12) und der niedrigere Plasma-Insulin-Spiegel (Tabelle 6) gut erklärbar.

Keine eindeutige Erklärung hingegen konnte für die Ursache der verminderten Insulinresistenz am Abend gefunden werden. Eine Beeinflussung des zweiten Tests durch den ersten erschien bei einem Zwischenraum von 2 Wochen als unwahrscheinlich, zumal Greenfield et al. (1981) bei 6-tägigem Abstand keine Unterschiede in der Insulinresistenz feststellte. Wahrscheinlicher erschienen Fütterungseinflüsse oder ein den Holstein-Friesian-Kühen eigener circadianer Rhythmus in der Insulinresistenz. Bei Ziegen war im Gegensatz zu diesen Untersuchungen die Glucose-Toleranz am Abend erniedrigt (Beck et al. 1983, Stangassinger, unveröffentlicht).

Der Unterschied in der Insulinresistenz zwischen fetten und normalen Tieren war in der vorliegenden Untersuchung gering und nicht signifikant, ging aber sowohl morgens als auch abends mit entsprechender Erhöhung der basalen Plasma-Spiegel von Glucose und Insulin bei fetten Tieren einher. Nicht in dieses Bild paßte die leicht verbesserte Glucose-Toleranz der fetten Kühe.

Die nur geringgradige Erhöhung der Insulinresistenz fatter Tiere deutete auf eine weit geringere Bedeutung dieses Zusammenhangs bei der Milchkuh als beim Menschen hin, wo adipöse Testgruppen beim Insulin-Suppressions-Test gegenüber Kontrollgruppen ein dreifach höheres Glucose-Plateau aufwiesen (Koltermann et al., 1979). Insbesondere fanden sich auch keine Anhaltspunkte dafür, daß Unterschiede in der Fettleibigkeit der Kühe eine mögliche Korrelation zwischen Glucose-Toleranz und Milchleistung überdeckten.

Die Mittelwerte von Insulinresistenz, Glucose-Toleranz sowie basalem Plasma-Spiegel von Glucose und Insulin zwischen trockenstehenden und milchgebenden Kühen der fetten Gruppe waren aufgrund der kleinen Gruppengrößen nur wenig aussagekräftig. Eine geringgradig erhöhte Insulinresistenz trockenstehender Tiere ging mit einer Erhöhung des Glucose- und Insulin-Spiegels einher. Ein weit größerer Unterschied wäre zu erwarten, wenn dem Insulin-unabhängigen Glucose-Abfluß ins Euter während des Tests, und damit erniedrigtem Glucose-Plateau, allzu große Bedeutung zukäme. So kann vermutet werden, daß über die Anhebung des Insulin-Spiegels und einhergehenden selektiven Abfluß der Blut-Glucose in Ziel-Gewebe die Aufnahme von Glucose ins Euter zumindest teilweise gehemmt wird. So wäre auch das Fehlen einer signifikanten Beziehung zwischen Milchleistung und der HWZ beim ivGTT der vorliegenden Untersuchung sowie der von Veitinger (1983) dadurch zu erklären, daß durch eine verstärkte Insulin-Sekretion während des ivGTT's die Glucose-Aufnahme ins Euter relativ erniedrigt war und somit eine unterschiedliche Milchleistung kaum einen Einfluß auf die Glucose-Toleranz hatte.

Die Insulinantwort-Kurven beim ivGTT zeigten einen in Fläche und maximaler Antwort individuell sehr unterschiedlichen Verlauf und konnten in keine sinnvolle Beziehung zur Insulinresistenz gebracht werden.

5. Zusammenfassung

Zur Bestimmung der Insulinresistenz wurden an 10 Holstein-Friesian-Kühen von unterschiedlichem Stoffwechselstatus morgens und abends euglykämische Glucose-Clamp-Tests durchgeführt. Mit einer Dauerinfusion von $6,88 \text{ mg Glucose} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und $3,44 \text{ mU Insulin} \cdot \text{kgKG}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ wurden im Zeitraum von 200 - 270 min nach Infusionsbeginn gleichmäßige Plateau-Werte für Glucose und Insulin im Blutplasma erreicht. Außerdem wurden an allen Kühen intravenöse Glucose-Toleranz-Tests durchgeführt und basale Plasma-Spiegel von Glucose und Insulin bestimmt. Metabolische Clearance-Raten für Insulin wurden berechnet. Inulin-Verteilungsräume wurden bestimmt.

1. Glucose-Plateau-Werte lagen im Mittel bei $3,36 \pm 0,58 \text{ mmol/l}$ Plasma und damit im Bereich physiologischer Plasma-Glucose-Spiegel. Sie dienten als Maß für die Insulinresistenz der Kühe. Insulin-Plateau-Werte lagen im Mittel bei $137,2 \pm 60,4 \text{ uU/ml}$.
2. Morgens waren die Kühe signifikant um 11% insulinresistenter als abends ($p < 0,05$). Fette Kühe und trockenstehende Kühe waren nur geringgradig insulinresistenter als Kontrollgruppen (n.s.).
3. Außerdem wiesen die Kühe morgens gegenüber abends eine um 21% signifikant verringerte Glucose-Toleranz ($p < 0,02$) und einen erhöhten Plasma-Glucose-Spiegel ($p < 0,005$) auf.
4. Unterschiede zwischen trockenstehenden und milchleistenden sowie fetten und normalgewichtigen Tiere im intravenösen Glucose-Toleranz-Tests und in den basalen Plasma-Spiegeln von Glucose und Insulin waren nicht signifikant. Fette und trockenstehende Tiere zeigten jedoch eine 10-20% bessere Glucose-Toleranz als Kontrollgruppen.
5. Insulinantwort-Kurven beim intravenösen Glucose-Toleranz-Test zeigten große individuelle Verlaufsunterschiede und konnten nicht in Zusammenhang zur gemessenen Insulinresistenz gebracht werden.

6. Die Metabolische Clearance-Rate für das exogen zugeführte Insulin lag im Mittel bei $6,8 \pm 2,37 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kgKG}^{-1}$. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten von Tiergruppen bzw. der unterschiedlichen Tageszeit festgestellt werden.
7. Eine positive Korrelation bestand zwischen dem basalen Plasma-Insulin-Spiegel und dem Insulin-Plateau ($p < 0,001$) und eine negative Korrelation zwischen basalem Plasma-Insulin-Spiegel und der Metabolischen Clearance-Rate ($p < 0,01$).
8. Der Inulinraum der Kühe lag im Mittel bei $114,6 \pm 18,7 \text{ ml/kg KG}$. Fette Tiere wiesen gegenüber der normalgewichtigen Gruppe einen um 29 % erniedrigten Inulinraum auf ($p < 0,01$). Der Unterschied zwischen zwei Einzelmessungen am gleichen Tier war häufig jedoch erheblich.

5.1 Summary

Estimation of insulin resistance in Holstein Friesian cows by use of the glucose clamp technique

For estimation of insulin resistance, euglycemic glucose clamp tests were performed on 10 Holstein Friesian cows with different metabolic status. The constant i.v. infusion rate was $6,88 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for glucose and $3,44 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ for insulin. Between 200 and 270 min after the start of infusion, steady state plasma levels for glucose and insulin were obtained. Furthermore intravenous glucose tolerance tests were performed on all cows in the morning and the evening and basal plasma insulin and plasma glucose were measured. Metabolic clearance rates were calculated for insulin. The insulin space was estimated after a single injection of insulin.

1. Steady state plasma glucose averaged $3,36 \pm 0,58 \text{ mmol/l}$, which was in the physiological range for plasma glucose in dairy cows. Therefore steady state plasma glucose levels were used as a measure for insulin resistance. Steady state plasma insulin averaged $137,2 \pm 60,4 \text{ uU/ml}$.
2. Morning measurements of insulin resistance were significantly higher (11%) than evening measurements ($p < 0,05$). Cows with increased adipositas and nonlactating animals only showed slightly increased insulin resistance when compared to control groups (n.s.).
3. Compared to evening measurements glucose tolerance was significantly lower ($p < 0,02$) and plasma glucose elevated ($p < 0,005$) in the morning.
4. There were no significant differences between non lactating and lactating cows and cows with different degrees in adipositas in the T-1/2 of the i.v. glucose tolerance test, plasma glucose and plasma insulin. Fat cows and non lactating cows tended to have a better glucose tolerance than control groups (10-20%).

5. There was a large variation in height and shape of the insulin answer during i.v. glucose tolerance tests. No connection between insulin answer and insulin resistance could be found.
6. The metabolic clearance rate for exogenous insulin averaged $6,8 \pm 2,37 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$. No significant differences between the mean values of different animal groups and different day time could be found.
7. There was a positive correlation between basal plasma insulin and steady state plasma insulin during the euglycemic clamp test ($p < 0,001$). A negative correlation was found between basal plasma insulin and metabolic clearance rate ($p < 0,01$).
8. The distribution volume of inulin for all cows averaged $114,6 \pm 18,7 \text{ ml/kg}$. Compared to animals with normal weight, fat animals showed a 29% lower inulin space ($p < 0,01$). However differences of 2 measurments in the same cow often were large.

6 Literaturverzeichnis

- Andersen, D.K., D. Elahi, J.C. Braun, J.D. Tobin u. R. Andres, 1978
Oral glucose augmentation of insulin secretion
J. Clin. Invest. 62 , 152-161
- Annison, E.F. u. J.L. Linzell, 1964
The oxidation and utilization of glucose and acetate by the
mammary gland of the goat in relation to their over all
metabolism and to milk formation
J. Physiology 175 , 372
- Athanasiou, V.N. u. R.W. Phillips, 1978
Effect of fasting on plasma metabolites and hormones
in lactating dairy cows
Am. J. Vet. Res. 39 , 957-960
- Athanasiou, V.N. u. R.W. Phillips, 1978
Stability of plasma metabolites and hormones in
parturient dairy cows
Am. J. Vet. Res. 39 , 953-956
- Baird, G.D., 1981
Liver metabolism in the dairy cow: problems involved in meeting
the demands of high productivity S 87-93
in: Metabolic Disorders in Farm Animals,
Giesecke, D., G. Dirksen u. M. Stangassinger
Proceedings of the IV. International Conference on Production
Disease in Farm Animals, München
- Baird, G.D., 1982
Primary ketosis in the high producing dairy cow. Clinical
and subclinical disorders, treatment, prevention and outlook
J. Dairy Sci. 65 , 1-11
- Bar, R.S., P. Gorden, J. Roth, C.R. Kahn u. P. de Meyts, 1976
Fluctuations in the affinity and concentration of insulin
receptors on circulating monocytes of obese patients.
Effects of starvation, refeeding and dieting
J. Clin. Invest. 58 , 1123-1135
- Bassett, J.M., 1981
Regulation of insulin and glucagon secretion in ruminants
in: Hormones and Metabolism in Ruminants, p. 65
Forbes, J.M., ed., Agric. Res. Counc. London

- Beck, U., M.Stangassinger, D. Giesecke und J. Meyer, 1983
The testing of insulin receptor activity in ruminants
Proceedings of the 5th Int. Conf. on Production Disease
in Farm Animals, Uppsala
Druck in Vorbereitung
- Bell, F.R. u. E.R. Jones, 1945
Glucose tolerance in the bovine
J. Comp. Path. 55 , 117-124
- Berzins, R. u. J.G. Manns, 1979
How concentrate feeding affects glucoregulatory hormones
in ruminants: implications to bovine ketosis
J. Dairy Sci. 62 , 1739-1745
- Bickerstaffe, R., E. F. Annison u. J. L. Linzell, 1974
The metabolism of glucose, acetate, lipids and amino
acids in lactating dairy cows
J. Agric. Sci. Cambridge 82 , 71-85
- Bines, J.A. u. I.C. Hart, 1982
Metabolic limits to milk production: especially roles of
growth hormone and insulin
J. Dairy Sci. 65 , 1375-1389
- Blum, J.W., R.B. Wilson u. D.S. Kronfeld, 1973
Plasma insulin concentrations in parturient cows
J. Dairy Sci. 56 , 459-464
- Boehnke E., 1971
Methodische Studien zur Elektrolytausscheidung bei
männlichen Saugkälbern und Jungbullen
Inaugural-Dissertation med. vet., München
- Brown, W.R., W.E. Petersen u. R.A. Gortner, 1936
The decrease in the lactose content of milk following the
production of artificial hypoglucaemia
J. Dairy Sci. 19 , 147-154
- Buckley, B.A., J.H. Herbein u. J.W. Young, 1982
Glucose kinetics in lactating and nonlactating dairy goats
J. Dairy Sci. 65 , 371-384
- Chakriyarat, S., H.H. Head, W.W. Thatcher, F.C. Neal u. C.J. Wilcox, 1978
Induction of lactation: lactational, physiological and hormonal
responses in the bovine
J. Dairy Sci. 61 , 1715-1724

- Chase, L.E., P.J. Wangsness u. R.J. Martin, 1977
Portal blood insulin and metabolite changes with spontaneous feeding in steers
J. Dairy Sci. 60 , 410-415
- Convey, E.M., 1974
Serum hormone concentrations in ruminants during mammary growth, lactogenesis and lactation: a review
J. Dairy Sci. 57 , 905-914
- Cowan, R.T., J.J. Robinson, F.D. Greenhalgh u. J. McHattie, 1979
Body composition changes in lactating ewes, estimated by serial slaughter and deuterium dilution
Anim. Prod. 29 , 91-99
- Croft, R.L., 1981
Handbook of Protein Sequence Analysis, S. 388-390
Sec. Edition, Verlag: J. Wiley & sons, Chichester, New York, Brisbane, Toronto
- Davidson, W. D. u. A. M. Sackner, 1963
Simplifications of the anthrone method for the determination of inulin clearance studies
J. of Lab. Clin. Med. 62 , 351-356
- Davies, P.J., 1973
Plasma glucose and acetone concentrations in pregnant and lactating ewes
Proc. of the Nutrition Society 32 , 1317
- De Fronzo, R.A. u. E. Ferranini, 1982
The pathogenesis of non insulin dependent diabetes, an update
Medicine (Baltimore) 61 , No. 3
- De Fronzo, R.A., V. Soman, R.S. Sherwin u. R. Hendler, 1978
Insulin binding to monocytes and insulin action in human obesity, starvation and refeeding
J. Clin. Invest. 62 , 204-213
- De Fronzo, R.A., J.O. Tobin u. R. Andres, 1979
Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance
Am. J. Physiol. 237 , E 214-223

- De Jong, A., 1982
Patterns of plasma concentrations of insulin and glucagon
after intravascular and intraruminal administration of volatile
fatty acids in the goat
J. Endocrinology 92 , 257
- Diem, K. u. C. Lentner, 1968
Wissenschaftliche Tabellen S.61
7. Auflage, Herausgeber: J.R. Geigy A.G., Pharma, Basel
- Doberne, L.M., M.S. Greenfield, B. Schulz u. G.M. Reaven, 1981
Enhanced glucose utilization during prolonged glucose clamp
studies
Diabetes 30 , 829-835
- Erb, R.E., 1977
Hormonal control of mammatogenesis and onset of lactation in cows:
a review
J. Dairy Sci. 60 , 155-166
- Foot, J.Z. u. J.F.D. Greenhalgh, 1970
The use of deuterium oxide space to determine the amount of body
fat in pregnant Black-Face ewes
Br. J. Nutr. 24 , 815-825
- Forsberg, N.E., N.E. Smith u. R.L. Baldwin, 1982
The roles of lactate, glucose and acetate in bovine mammary
metabolism
Am. Dairy Sci. Association 65 , 87
- Frobish, R.A. u. C.L. Davis, 1977
Effects of abomasal infusions of glucose and propionate on milk
yield and composition
J. Dairy Sci. 60 , 204-209
- Frohman, L.A., J.K. Goldman u. L.L. Bernardis, 1972
Studies of insulin sensitivity in vivo in weanling rats with
hypothalamic obesity
Metabolism 21 , 1133
- Furtmayr, L., 1975
Untersuchungen über Metabolitenkonzentrationen und
Enzymaktivitäten im Blutserum von Hochleistungsrindern
Inaugural-Dissertation med. vet., München

- Giesecke, D., 1981
Productivity and metabolic regulation - an introduction, S. 3-5
in: Metabolic disorders in farm animals
Giesecke, D., G. Dirksen u. M. Stangassinger,
Proceedings of the IV. international conference on production
disease in farm animals, München
- Giesecke, D. u. M. Stangassinger, 1982
Limits of metabolic performance in high yielding dairy cows
Animal Research and Development 16 , 95-105
- Ginsberg, H., G. Kimmerling, J.M. Olefsky u. G.M. Reaven, 1975
Demonstration of insulin resistance in untreated adult onset
diabetic subjects with fasting hyperglucemia
J. Clin. Invest. 55 , 454-461
- Gould, A.C., 1981
Diabetes mellitus in cattle
Veterinary Record 109 , 539
- Gowen, J.W. u. E.R. Tobey, 1931
On the mechanism of milk secretion: the influence of insulin and
phlorizin
J. Gen. Physiol 15 , 67
- Greenfield, M.S., L. Doberne, F. Kraemer, T. Tobey u. G. Reaven, 1981
Assessment of insulin resistance with the insulin suppression test
and the euglycemic clamp
Diabetes 30 , 387-392
- Guisti, L. u. C. T. Rietti, 1923
Accion de la insulina sobre la composition de la leche
Rev. Assoc. Med. Arg. Soc. Biol. 36 , 279
- Hart, I.C., J.A. Bines u. S.V. Morant, 1979
Endocrine control of energy metabolism in the cow: correlations
of hormones and metabolites in high and low yielding cows for
stages of lactation
J. Dairy Sci. 62 , 270
- Hart, I.C., J.A. Bines u. S.V. Morant, 1980
The secretion and metabolic clearance rates of growth hormone,
insulin and prolactin in high and low yielding cattle at four
stages of lactation
Life Sci. 27 , 1839

- Hartmann, P.E. u. D.S. Kronfeld, 1973
Mammary blood flow and glucose uptake in lactating cows given dexamethasone
J. Dairy Sci. 56 , 896-903
- Head, H.H., S. Chakriyarat, W.W. Thatcher, C.J. Wilcox u. H.N. Becker, 1982
Induction of lactation: comparison of injections of estradiol-17 β and progesterone for 7 or 21 days on prolactin response to thyrotropin releasing hormone and milk yield in dairy cattle
J. Dairy Sci. 65 , 927-936
- Holmes, J.R., 1951 a
Carbohydrate metabolism in the bovine
I. Intravenous glucose tolerance in the healthy cow
II. Intravenous glucose tolerance in various diseases, including bovine ketosis
J. Comp. Path. 61 , 1-25
- Home, P.D., G.A.A. Shepherd, I. Hanning, K.G.M. Alberti u. D.R. Owens, 1982
A comparison of the activity and disposal of semi-synthetic human insulin and porcine insulin in normal men by the glucose clamp technique
Diabetologica 22 , 41
- Hove, Knut, 1978
Insulin secretion in lactating cows: responses to glucose infused intravenously in normal, ketonemic and starved animals
J. Dairy Sci. 61 , 1407-1431
- Hove, Knut, 1974
Nocturnal plasma insulin levels in cows with varying levels of plasma ketone bodies; relations to plasma sugar and acetoacetate
Acta Endocrinologica 76 , 513-524
- Insel, P.A., J.E. Liljenquist, J.D. Tobin, R.S. Sherwin, P. Watkins, R. Andres u. M. Berman, 1975
Insulin control of glucose metabolism in man
J. Clin. Invest. 55 , 1057-1066
- Johnson, H.D. u. W.J. Vanjonack, 1976
Effects of environmental and other stressors on blood hormone patterns in lactating animals
J. Dairy Sci. 59 , 1603
- Jones, G.M., E.E. Wildmann, H.F. Troutt jr., T.N. Lesch, P.E. Wagner, R.L. Boman u. N.M. Lanning, 1982
Metabolic profiles in Virginia dairy herds of different milk yields
J. Dairy Sci. 65 , 683-690

- Kaneko, J.J., 1980
Clinical biochemistry of domestic animals
Third Edition, Academic Press, N.Y. 28
- Kitabchi, A.E., 1970
The biological and immunological properties of pork and beef
proinsulin and connecting peptides
J. Clin. Invest. 49 , 979-987
- Kloe, U., 1983
Glucosetoleranz und renale Glucoseausscheidung bei Zwergziegen
Inaugural-Dissertation med. vet., München
- Koltermann, O.G., G.M. Raeven u. J.M. Olefsky, 1979
Relationship between in vivo insulin resistance and decreased
insulin receptors in obese man
J. Clin. Endocrin. Metabol. 48 , No. 3
- Kosak, F., 1980
Untersuchungen über die Konzentration der Freien Fettsäuren im
Blutplasma zur Ermittlung stoffwechselphysiologischer Leistungs-
grenzen bei Hochleistungskühen
Inaugural-Dissertation med. vet., München
- Kraegen, D.S., D.E. James, S.P. Bennett u. D.J. Chisholm, 1983
In vivo insulin sensitivity in the rat determined by the euglycemic
clamp
Am. J. Physiol. 245 , E1-E7
- Kronfeld, D.S., 1971
Hypoglycemia in ketotic cows
J. Dairy Sci. 54 , 949-960
- Kronfeld, D.S., S. Donoghue, R.L. Lopp, F.M. Stearns u. R.H. Engle, 1982
Nutritional status of dairy cows indicated by analysis of blood
J. Dairy Sci. 65 , 1925-1933
- Kronfeld, D.S. u. R.S. Emery, 1970
in: Bovine Medicine and Surgery, 350
Gibbons, W.J., E.J. Catcott u. J.F. Smith, ed.
Amer. Vet. Publ. Wheaton Illinois
- Kronfeld, D.S., G.P. Mayer, J. Robertson u. F. Raggi, 1963
Depression of milk secretion during insulin administration
J. Dairy Sci. 46 , 559-563

- Kronfeld, D.S., C.F. Jr. Ramberg u. D.M. Shames, 1971
Multicompartmental analysis of glucose kinetics in normal
and hypoglycemic cows
Am. J. Physiol. 220 , 886-893
- Kuhn, N.J., D.T. Carrick u. C.J. Wilde, 1980
Lactose synthesis: The possibilities of regulation
J. Dairy Sci. 63 , 328-336
- Kunz, P. u. J.W. Blum, 1981
Effect of pre- and post parturient energy intake on blood plasma
levels of hormones and metabolites in cows, S. 49-53
in: Metabolic disorders in farm animals
Giesecke, D., G. Dirksen u. M. Stangassinger,
Proceedings of the IV. international conference on production
disease in farm animals, München
- Ladegaard-Pederson, H.J., 1972
A comparison of the distribution volumes of inulin and 51-Cr-EDTA
in man and nephrectomized dogs
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 30 , 267
- Ladegaard-Pederson, H.J., 1972
Measurement of extracellular volume and renal clearance by a single
injection of inulin
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 29 , 145-153
- Levine, R. u. M.S.V. Goldstein, 1955
Mechanism of hormone action: on the mechanism of action of insulin
Recent Prog. Hormon. Res. 11 , 343-380
- Lindsay, D.B., 1971
Changes in the pattern of glucose metabolism in growth, pregnancy
and lactation in ruminants
Proc. Nutr. Soc. 30 , 272-277 (En)
- Linzell, J.L., 1967
The effect of infusions of glucose, acetate and amino acids on hourly
milk yield in fed, fasted and insulin-treated goats
J. Physiol. 190 , 347-357
- Littledike, I.T., D.A. Wittel u. S.C. Whipp, 1968
Insulin: evidence for inhibition of release in spontaneous hypocalcemia
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 129 , 135-139
- Loensmann-Poulsen, H., H.AE. Jensen u. H.E. Parving, 1977
Extracellular fluid volume determined by a single injection of inulin
in man with untreated essential hypertension
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 37 , 691-696

- Mayer, J., 1978
Physiologische und pathologische Einflüsse auf den Lactosegehalt
der Kuhmilch
Inaugural-Dissertation, Med. Vet., München
- McClure, T.J., 1977
Effect of feed quality and stage of lactation on the concentration
of glucose in the blood of lactating cattle
Austr. J. Agric. Res. 28 , 341-344
- Meier, P. u. K. L. Zierler, 1954
On the theory of the indicator dilution method for measurement of
blood flow and volume
J. Appl. Physiol. 6 , 731-744
- Meistas, M., S. Margolis u. A.A. Kowarski, 1983
Hyperinsulinemia of obesity is due to decreased clearance of insulin
Am. J. Physiol. 245 , E155-E159
- Metz, R. u. R. Friedenberg, 1970
Effects of repetitive glucose loads on plasma concentrations of
glucose, insulin and free fatty acids: paradoxical insulin responses
in subjects with mild glucose intolerance
J. Clin. Endocr. 30 , 602-608
- Mirsky, I.A., 1964
The metabolism of insulin
Diabetes 13 , 225-229
- Milling, M., 1966
Das Verhalten der Glucosewerte im Blut bei Kälbern
Zbl. Vet. Med. 13 , 42-52
- Olefski, J.M., 1976
Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes
from obese subjects
J. Clin. Invest. 57 , 1165-1172
- Olefski, J.M., 1976
Effects of fasting on insulin binding, glucose transport and glucose
oxidation in isolated rat adipocytes
J. Clin. Invest. 58 , 1450-1460
- Olefski, J.M. u. G.M. Reaven, 1975
Effects of age and obesity on insulin binding to isolated adipocytes
Endocrinology 96 , 1486

- Olefski, J.M., G.M. Reaven u. R. Farquhar, 1974
Studies of lipid and carbohydrate metabolism in normal and hyperlipoproteinemic subjects
J. Clin. Invest. 53 , 64-76
- Palmquist, D.L. u. E.A. Moser, 1981
Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilisation and milk protein content of lactating cows
J. Dairy Sci. 64 , 1664-1670
- Partale, V., 1971
Radioimmunologische Bestimmungen von Insulin im Plasma und Serum von Kälbern und Kühen
Inaugural-Dissertation, med. vet., Hannover
- Pehrson, B. u. M. Knutsson, 1980
Glucose, lactose and starch digestion in the small intestine of dairy cows, S. 26-29
in: Metabolic disorders in farm animals
Giesecke, D., G. Dirksen u. M. Stangassinger, ed.
Proc. IV. Int. Conf. on Prod. Disease in Farm Animals, München
- Peruche, Th., 1981
Untersuchungen über die diabetogene Wirkung von Streptozotocin bei Zwergziegen
Inaugural- Dissertation, med. vet., München
- Phillips, R.W. u. V.N. Athanasiou, 1978
Stability of plasma metabolites and hormones in lactating dairy cows
Am. J. Vet. Res. 39 , 949-952
- Prasad, M.C. u. P.L. Kaul, 1981
Glucose tolerance test in goats
Zbl. Vet. Med. A. 28 , 732-736
- Radloff, H.D. u. L.H. Schultz, 1966
Hormonal regulation of plasma free fatty acid concentration in ruminants
J. Dairy Sci. 49 , 971
- Reid, R.L., 1958
Studies on the carbohydrate metabolism of sheep:
VII. Intravenous glucose- and acetate-tolerance tests
Austr. J. Agric. Res. 9 , 789-796

- Rizkalla, S.W., Y. Lebouc, P. Serog u. M. Apfelbaum, 1981
Carbohydrate intake affects insulin binding to human erythrocytes
in normal weight subjects but not in subjects with family obesity
Metabolism 30 , 900-907
- Robelin, J., 1982
A note using the estimation in vivo of body-fat in cows using
deuterium oxide or adipose cell-size
Anim. Prod. 34 , 347-350
- Rook, J.A.F. u. J.V. Wheelock, 1967
The secretion of water and of watersoluble constituents in milk
J. Dairy Res. 34 , 273-287
- Ross, G., L. Lickley u. M. Vranic, 1978
Extrapancratic glucagon in control of glucose turnover in
depancreatized dogs
Am. J. Physiol. 234 , E 213-219
- Sachs, L., 1972
Statistische Auswertungsmethoden
Springer Verlag/Heidelberg-Berlin-New York
- Schmidt, G.H., 1966
Effect of insulin on yield and composition of milk in dairy cows
J. Dairy Sci. 49 , 381-385
- Schwalm, J.W. u. L.H. Schultz, 1976
Relationship of insulin concentration to blood metabolites in the
dairy cow
J. Dairy Sci. 59 , 255-261
- Shaw, J.C., 1943
Studies on ketosis in dairy cattle: the development of ketosis
J. Dairy Sci. 26 , 1079-1090
- Sherwin, R.S., K.J. Kramer, J.D. Tobin, P.A. Insel, J.E. Liljenquist,
M. Berman u. R. Andres, 1974
A model of the kinetics of insulin in man
J. Clin. Invest. 53 , 1481-1492
- Stangassinger, M., 1983
Mündliche Mitteilungen

- Stangassinger, M. u. Th. Peruche, 1980
Metabolism of glucose during experimental diabetes in ruminants
in: Metabolic Disorders in Farm Animals
Giesecke D., G. Dirksen u. M. Stangassinger, ed.
Proc. IV. Int. Conf. on Prod. Disease in Farm Animals, München
- Starr, J.I., D.L. Horwitz, A.H. Rubenstein u. M.E. Mako, 1979
Insulin, proinsulin and c-peptide, 613-638
in: Methods of Hormone Radioimmunoassay
Behrmann, J., ed., N.Y.
- Steiner, D.F., 1976
Insulin today
Diabetes 26 , 322-340
- Steiner, D.F., O. Hallund u. A. Rubenstein, 1968
Isolation and properties of proinsulin, intermediate forms and other
minor components from crystalline bovine insulin
Diabetes 17 , 725-736
- Sutherland, E.W. u. G.A. Robinson, 1969
The role of cyclic AMP in the control of carbohydrate metabolism
Diabetes 18 , 797-819
- Terris, S. u. D.F. Steiner, 1976
Retention and degradation of 125-J - insulin by perfused rat livers
J. Clin. Invest. 57 , 885-896
- Thornton, J.H. u. L.H. Schultz, 1980
Effects of administration of nicotinic acid on glucose, insulin and
glucose tolerance in ruminants.
J. Dairy Sci. 63 , 262-268
- Trenkle, A., 1971
Postprandial changes in insulin secretion rates in sheep
J. Nutr. 101 , 1099-1104
- Trenkle, A., 1978
Relation of hormonal variations to nutritional studies and metabolism
in ruminants
J. Dairy Sci. 61 , 281-293
- Truscott, T.G., J.D. Wood u. N.G. Gregory, 1983
Fat deposition in Hereford and Frisian steers
J. Agric. Sci. 100 , 277-284

- Vasilatos, R. u. P.J. Wangsness, 1981
Diurnal variations in plasma insulin and growth hormone, associated
with two stages of lactation in high producing dairy cows
Endocrinology 108 , 300-304
- Veitinger, W., 1983
Untersuchungen über die Insulinfunktion zu Beginn der Laktation bei
Kühen der Rassen Holstein Friesian und Deutsches Fleckvieh
Inaugural-Dissertation, med. vet., München
- Vranic, M., P. Fono, N. Kovacevic u. B.J. Lin, 1971
Glucose kinetics and fatty acids in dogs on matched insulin in-
fusion after glucose load
Metabolism 20 , 954-967
- Walsh, D.S., J.A. Vesely u. S. Mahadevan, 1980
Relationship between milk production and circulating hormones
in dairy cows
J. Dairy Sci. 63 , 290-294
- Weekes, T.E.C., Y. Sasaki u. T. Tsuda, 1983
Enhanced responsiveness to insulin in sheep exposed to cold
Am. J. Physiol. 244 , 335-345
- Whichelow, M.J., R.A. Sturge, H. Keen, R.J. Jarrett u. R. Stimmeler, 1974
Diurnal variation in response to intravenous glucose
Br. Med. J. 1 , 488-491
- Wiseman, K. u. B.F. Baltz, 1961
Prevention of insulin adsorption to glass
Endocrinology 68 , 354-356

Der Leitung des Instituts danke ich für die gewährten Arbeitsmöglichkeiten. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Giesecke für die Überlassung des Themas und die jederzeit gern gewährte Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich auch bei Frau Dr. Ulrike Beck, die mich bei der praktischen Durchführung der Versuche hervorragend unterstützte. Herrn Dr. M. Stangassinger danke ich für seine Anregungen und Hilfestellungen bei der theoretischen Auswertung der vorliegenden Arbeit und die Berechnung der Inulin-Kompartiment-Studie. Auch allen Mitarbeitern des Labors sei für ihre Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit gedankt.

Vielen Dank möchte ich auch richten an Herrn Prof. Dr. J. Meyer und Herrn Wittmann vom Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim der Tiermedizinischen Fakultät München, die mir die Versuchstiere zur Verfügung stellten, bzw. deren Haltung und Handhabung übernahmen.

LEBENS LAUF

Wilhelm Thevis	geboren am 30. Juli 1957 in Oberndorf/Neckar
Eltern	Paul Thevis Maria Karola Thevis, geb. Eigelshoven
Familienstand	ledig
Schul Ausbildung	1962-1966: Besuch der Grundschule Oberndorf Dez.1966-Juli 1974: Besuch des mathematisch-natur- wissenschaftlichen Gymnasiums Oberndorf bis einschließ- lich Klasse 11 Aug.1974-Aug.1975: Aufenthalt in El Paso, Texas, U.S.A. als Austauschschüler Aug.1975-Mai 1976: Besuch der 13. Gymnasialklasse in Oberndorf mit Abitur als Abschluß
Wehrdienst	Juli 1976 -Sept.1977
Universitäts- ausbildung	Seit Nov. 1977: Student der Tiermedizin an der Tierärztl- ichen Fakultät der Ludwig-Maximilian Universität München Dez.1982: Abschluß des Staatsexamens Feb.1983: Approbation als Tierarzt Seit Nov.1982: Doktorand bei Herrn Prof. Dr. D. Giesecke am Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Ernährungsphysiologie im Fachbereich Tiermedizin der LMU- München

